



**Ana Margarida Pisco do Nascimento**

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

## **Qualificação de Performance das máquinas de lavagem de material do Controlo da Qualidade dos Laboratórios Vitória**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Eng. Luis Rosa, Laboratórios Vitória, S.A.  
Co-orientador: Prof. Dr. Mário Eusébio, FCT-UNL



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Setembro de 2017**



**Ana Margarida Pisco Do Nascimento**

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

**Qualificação de Performance das máquinas de lavagem  
de material do Controlo da Qualidade dos Laboratórios  
Vitória**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Eng. Luis Miguel Rosa, Laboratórios Vitória, S.A.

Co-orientador: Prof. Dr. Mário Eusébio, FCT-UNL

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA  
Faculdade de Ciências e Tecnologias  
Departamento de Química

**Setembro 2017**



Esta dissertação está escrita sob as regras do novo acordo ortográfico.



**Qualificação de Performance das máquinas de lavagem de material do Controlo da Qualidade dos Laboratórios Vitória**

Copyright © Ana Margarida Pisco do Nascimento, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.





“O sucesso nasce do querer da determinação  
e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo  
não atingindo o alvo, quem busca e vence  
obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar



## Agradecimentos

Concluída mais uma etapa da minha formação académica, é necessário agradecer a diversas pessoas que tornaram todo este percurso mais fácil.

Em primeiro lugar, quero agradecer aos Laboratórios Vitória a oportunidade de realização de estágio, em particular aos meus colegas do Controlo da Qualidade. O acolhimento, a facilidade de integração e o apoio constante foram sem dúvida uma mais valia para mim.

Quero agradecer também ao meu orientador, Eng. Luis Miguel Rosa, pelo acompanhamento, disponibilidade e por todos os conhecimentos transmitidos ao longo destes últimos 6 meses. Agradeço igualmente ao professor Mário Eusébio pelo incentivo, preocupação constante e disponibilidade prestada durante a realização da dissertação.

Tânia Dimas e Diana Kharina, as minhas amigas do coração, obrigada pela amizade verdadeira e por termos partilhado estes últimos 5 anos da melhor forma possível.

Carla Cravo e Sara Tenreira, um obrigado não chega para descrever aquilo que fizeram por mim. A ajuda e os conselhos dados nunca serão esquecidos.

João, obrigada por estares sempre presente, por me motivares e acreditares sempre em mim.

Por fim, um agradecimento muito especial à minha mãe, irmã, avó e avô. Nunca teria atingido os meus objetivos sem o vosso esforço, paciência e amor. Aquilo que sou devo-o a vocês e não poderia orgulhar-me mais da família que tenho. Obrigada pela força transmitida e por tornarem tudo possível.

Muito obrigada a todos!



## Resumo

As diversas análises efetuadas a matérias primas, produto a granel e produto acabado são uma prática bastante comum na rotina laboratorial das indústrias farmacêuticas. Estas efetuam-se com o objetivo de assegurar que os produtos se encontram dentro dos padrões de qualidade exigidos e, a sua execução, requer a utilização de material de laboratório adequado e isento de contaminações, sendo de extrema importância garantir que os procedimentos de limpeza dos materiais estão a ser efetuados corretamente.

Assim, um dos principais objetivos deste trabalho consiste na qualificação da *performance* das três máquinas de lavar material de laboratório do Controlo da Qualidade dos Laboratórios Vitória (G7835CD, PG8583CD e G7733). A qualificação inclui a contaminação do material por diversas substâncias: detergentes utilizados nos programas de lavagem das máquinas, uma substância solúvel em água e outra insolúvel, sendo efetuada uma análise de risco para a escolha do pior caso. Inerente à qualificação, pretende-se também validar um método analítico por HPLC para a deteção da substância pior caso, correspondente à substância insolúvel.

O método analítico para a deteção da substância pior caso por HPLC mostrou ser seletivo, linear ( $r=0,99993$ ), exato (Taxa média de recuperação=99,63%), preciso (CV=2,88%) e robusto (as alterações efetuadas a cada fator não produzem um efeito significativo no método analítico), cumprindo todos os critérios de aceitação estabelecidos.

No decorrer dos procedimentos de qualificação das máquinas Miele G7835CD e PG8583CD constatou-se que o neutralizante utilizado contaminava o material, o que levou à sua substituição por água purificada nos programas de lavagem respetivos. Após isso, verificou-se que os equipamentos executavam uma correta lavagem/descontaminação do material, assegurando os limites de aceitação estabelecidos através das técnicas de condutividade, TOC e HPLC.

Após a qualificação da *performance* da máquina Miele G7733 verificou-se que esta realiza a lavagem do material de forma eficiente, deixando-o com resíduos de substâncias contaminantes em níveis aceitáveis.

**Palavras-chave:** Qualificação de *performance*, validação de método analítico, contaminação, máquinas de lavagem de material de laboratório



## Abstract

The various analyzes carried out on raw materials, bulk product and finished product are a fairly common practice in the laboratory routine of the pharmaceutical industries. These are performed with the aim of ensuring that the products meet the required quality standards. Their execution requires the use of suitable laboratory material and free from contamination, so it is extremely important to ensure that the cleaning procedures of the materials are carried out correctly, i.e, that material's washing machines are efficient in contaminants removing.

Thus, one of the main objectives of this work is to qualify the performance of three laboratory washing machines of Quality Control department of Laboratórios Vitória (G7835CD, PG8583CD and G7733). The qualification includes the contamination of the material by several substances, such as, detergents used in washing programs, a water-soluble substance and an insoluble substance, and a risk analysis is carried out to choose the worst case. Inherent in the qualification, it is also intended to validate an analytical method by HPLC for the detection of the worst case substance, corresponding to a insoluble substance.

The analytical method for the detection of the worst case substance by HPLC showed to be selective, linear ( $r = 0.99993$ ), exact (Mean recovery rate = 99.63%), precise (CV = 2.88%) and robust (the changes made to each factor do not produce a significant effect on the analytical method), fulfilling all established acceptance criteria.

During the qualification procedures of the Miele G7835CD and PG8583CD machines it was found that the neutralizer contaminated the material, which led to its replacement with purified water in the respective washing programs. Afterwards, the equipment was verified to perform a correct washing / decontamination of the material, assuring the limits of acceptance established through the techniques of conductivity, total organic carbon and high performance liquid chromatography.

After qualifying the performance of the Miele G7733 machine it was verified that it performs efficiently the washing of the material, leaving that with residues with acceptable levels of contaminated substances.

**Keywords:** Performance qualification, analytical method validation, contamination, laboratory material washing machines





# Índice

1.	Introdução .....	1
1.1	Enquadramento e motivação .....	1
1.2	Laboratórios Vitória, S. A.....	1
2.	Qualidade Farmacêutica .....	3
2.1	O Sistema de Qualidade Farmacêutica .....	3
2.1.1	Boas Práticas de Fabrico.....	4
2.1.2	Controlo da Qualidade .....	5
2.1.3	Garantia da Qualidade .....	5
2.2	Legislação Farmacêutica .....	5
2.3	Limpeza na Indústria Farmacêutica .....	7
2.3.1	Contaminação na indústria farmacêutica .....	7
2.3.2	Agentes e mecanismos de limpeza .....	8
2.3.3	Análise de risco e identificação do pior caso .....	9
2.3.4	Identificação dos pontos críticos.....	9
2.4	Validação e Qualificação .....	9
2.4.1	Tipos de validação .....	10
2.4.2	Etapas de uma validação.....	10
2.4.3	Validação de métodos analíticos.....	12
2.5	Metodologia Analítica .....	21
2.5.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-UV).....	21
2.5.2	Carbono Orgânico Total (TOC) .....	25
2.5.3	Condutimetria .....	29
2.6	Tratamento de resultados - Testes estatísticos .....	30
2.7	Descrição das substâncias utilizadas na qualificação.....	35
3.	Metodologia, materiais e métodos.....	39
3.1	Qualificação da performance das máquinas de lavagem de material .....	39
3.1.1	Planeamento da qualificação .....	39
3.1.2	Materiais e equipamentos .....	40
3.1.3	Análise de risco e identificação do pior caso .....	42
3.1.4	Preparação das substâncias contaminantes .....	43
3.1.5	Determinação dos critérios de aceitação.....	44

3.1.6	Funcionamento das máquinas de lavagem de material do Controlo da Qualidade.	45
3.1.7	Contaminação do material .....	49
3.1.8	Enxaguamento após lavagem - Preparação das soluções amostra .....	52
3.2	Validação do método analítico por HPLC – Sulfametoxazol .....	56
3.2.1	Materiais e equipamentos .....	57
3.2.2	Condições cromatográficas .....	57
3.2.3	Preparação das soluções .....	58
4.	Apresentação e discussão de resultados obtidos .....	65
4.1	Qualificação da performance das máquinas de lavagem de material .....	65
4.2	Validação do método analítico por HPLC – Sulfametoxazol .....	98
5.	Conclusões e propostas para trabalhos futuros .....	117
	Referências bibliográficas .....	119
	Anexos A.....	123
	Anexos B.....	164
	Anexos C.....	164

# Índice de figuras

Figura 2.1 - Etapas de uma qualificação (Adaptado de [14]) .....	11
Figura 2.2 - Primeira coluna num desenho fatorial para N=8 [26].....	20
Figura 2.3 - Matriz usada num desenho fatorial de 7 fatores com 8 experiências [26] .....	20
Figura 2.4 - Percorso efetuado pela fase móvel no sistema de HPLC (Adaptado de [31]) .....	22
Figura 2.5 - Representação esquemática do aparelho TOC [35].....	27
Figura 2.6 - Estrutura química do sulfametoxazol [40] .....	35
Figura 2.7 - Estrutura química do Cloreto de Sódio [42].....	36
Figura 3.1 - Descrição da máquina Miele G 7835 CD [55].....	46
Figura 3.2 - Descrição da máquina Miele PG 8583 CD [56].....	47
Figura 4.1 - Diagrama de Ishikawa para a contaminação da máquina de lavar G 7835 CD.....	66
Figura 4.2 - Pontos analisados para a determinação dos pontos críticos da máquina G 7835 CD ...	72
Figura 4.3 - Pontos analisados para a determinação dos pontos críticos da máquina G 7835 CD ...	73
Figura 4.4 - Pontos analisados para a determinação dos pontos críticos da máquina PG 8583 CD.	82
Figura 4.5 - Pontos analisados para a determinação dos pontos críticos da máquina PG 8583 CD.	83
Figura 4.6 - Pontos analisados para a determinação dos pontos críticos da máquina G 7733 .....	90
Figura 4.7 - Pontos analisados para a determinação dos pontos críticos da máquina G 7733 .....	91
Figura 4.8 - Cromatograma obtido na primeira injeção do vial composto pela água de enxaguamento do T3 .....	96
Figura 4.9 - Cromatograma obtido na segunda injeção do vial composto pela água de enxaguamento do T3 .....	96
Figura 4.10 - Cromatograma obtido na primeira injeção do vial composto pela água de enxaguamento do copo de filtração (2).....	97
Figura 4.11 - Cromatograma obtido na segunda injeção do vial composto pela água de enxaguamento do copo de filtração (2).....	98
Figura 4.12 - Cromatograma obtido da primeira injeção da fase móvel .....	99
Figura 4.13 - Cromatograma obtido da primeira injeção da solução de Neodisher FLA .....	99
Figura 4.14 - Cromatograma obtido da primeira injeção da solução de Labwash .....	99
Figura 4.15 - Cromatograma obtido da primeira injeção da solução padrão .....	99
Figura 4.16 - Cromatograma obtido da primeira injeção da solução placebo reforçada .....	100
Figura 4.17 - Curva de calibração obtida no estudo da linearidade .....	100
Figura 4.18 - Reta de calibração obtida.....	104
Figura 4.19 - Representação gráfica do desvio padrão em função da concentração .....	105



## Índice de tabelas

Tabela 1.1 - Área ocupada por cada seção [2] .....	2
Tabela 2.1 - Características estudadas dependendo do tipo de procedimento analítico que se pretende [24],[25] .....	13
Tabela 2.2 - Fases ligantes correntemente mais utilizadas (Adaptado de [29]) .....	24
Tabela 2.3 - Processos pelos quais pode ocorrer a oxidação de compostos orgânicos a CO <sub>2</sub> , por TOC [33] .....	26
Tabela 2.4 - Processos pelos quais pode ser efetuada a análise quantitativa do Dióxido de Carbono [33] .....	27
Tabela 2.5 - Análise de variância - ANOVA .....	32
Tabela 3.1 - Planeamento da qualificação .....	40
Tabela 3.2 - Categorização do parâmetro toxicidade do produto .....	42
Tabela 3.3 - Categorização do parâmetro solubilidade da substância ativa na água .....	42
Tabela 3.4 - Categorização do parâmetro da concentração de substância ativa no produto .....	42
Tabela 3.5 - Resumo da análise de risco para os três substâncias ativas estudados [47],[48],[49],[50],[51],[52] .....	43
Tabela 3.6 - Características dos programas de lavagem utilizados por cada máquina .....	48
Tabela 3.7 - Identificação das máquinas de lavar e respetivos programas de lavagem .....	49
Tabela 3.8 - Volume de solução contaminante necessário para a contaminação do material .....	50
Tabela 3.9 - Procedimento de extração do sulfametoxazol, após o processo de lavagem .....	53
Tabela 3.10 - Procedimento de extração do cloreto de sódio e neodisher FLA, após o processo de lavagem .....	54
Tabela 3.11 - Procedimento de extração do Neodisher Z e Labwash, após o processo de lavagem .....	55
Tabela 3.12 - Condições cromatográficas adotadas pela farmacopeia europeia .....	58
Tabela 3.13 - Condições cromatográficas utilizadas na validação .....	58
Tabela 3.14 - Preparação das soluções para o ensaio da linearidade .....	60
Tabela 3.15 - Preparação das soluções placebo com sulfametoxazol .....	61
Tabela 3.16 - Esquema representativo da execução de precisão intermédia .....	61
Tabela 3.17 - Fatores e níveis experimentais .....	62
Tabela 3.18 - Matriz utilizada no ensaio da robustez .....	63
Tabela 4.1 - Valores de TOC obtidos do enxaguamento do material contaminado com Labwash (Dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele G 7835 CD .....	65
Tabela 4.2 - Valores de TOC obtidos do enxaguamento de material por contaminar e submetido à lavagem na máquina Miele G 7835 CD .....	67
Tabela 4.3 - Valores de TOC obtidos do enxaguamento de material por contaminar e submetido à lavagem na máquina Miele G 7835 CD (Máquina injeta apenas detergente e água purificada) .....	68
Tabela 4.4 - Valores de TOC obtidos do enxaguamento do material contaminado com Labwash (Dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele G 7835 CD .....	69
Tabela 4.5 - Valores de TOC obtidos do enxaguamento do material contaminado com Labwash (Dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele G 7835 CD .....	70
Tabela 4.6 - Ensaio 1 para o estudo dos pontos críticos com balões volumétricos de 150 ml .....	71

Tabela 4.7 - Ensaio 2 para o estudo dos pontos críticos com balões volumétricos de 150 ml.....	71
Tabela 4.8 - Ensaio 3 para o estudo dos pontos críticos com balões volumétricos de 150 ml.....	71
Tabela 4.9 - Ensaio 1 para o estudo dos pontos críticos com pipetas graduadas de 25 ml.....	72
Tabela 4.10 - Ensaio 2 para o estudo dos pontos críticos com pipetas graduadas de 25 ml.....	72
Tabela 4.11 - Ensaio 3 para o estudo dos pontos críticos com pipetas graduadas de 25 ml.....	73
Tabela 4.12 - Valores de condutividade obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por cloreto de sódio (dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele G7835 CD..	73
Tabela 4.13 - Valores de condutividade obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por cloreto de sódio (dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele G7835 CD..	74
Tabela 4.14 - Valores de condutividade obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por neodisher FLA (dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele G7835 CD.....	75
Tabela 4.15 - Valores de condutividade obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por neodisher FLA (dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele G7835 CD.....	76
Tabela 4.16 - Teores em sulfametoxazol obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por sulfametoxazol (dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele G 7835 CD ..	77
Tabela 4.17 - Teores em sulfametoxazol obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por sulfametoxazol (dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele G 7835 CD ..	77
Tabela 4.18 - Valores de TOC obtidos do enxaguamento do material contaminado com Labwash (Dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele PG 8583 CD.....	79
Tabela 4.19 - Valores TOC obtidos do enxaguamento de material por contaminar e submetido à lavagem na máquina Miele PG 8583 CD .....	79
Tabela 4.20 - Valores de TOC obtidos do enxaguamento de material por contaminar e submetido à lavagem na máquina Miele PG 8583 CD (Máquina injeta apenas detergente e água purificada) ...	80
Tabela 4.21 - Valores de TOC obtidos do enxaguamento de material contaminado com Labwash (Dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele PG 8583 CD.....	80
Tabela 4.22 - Valores de TOC obtidos do enxaguamento de material contaminado com Labwash (Dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele PG 8583 CD.....	80
Tabela 4.23 - Ensaio 1 para o estudo dos pontos críticos com balões volumétricos de 150 ml.....	81
Tabela 4.24 - Ensaio 2 para o estudo dos pontos críticos com balões volumétricos de 150 ml.....	81
Tabela 4.25 - Ensaio 3 para o estudo dos pontos críticos com balões volumétricos de 150 ml.....	82
Tabela 4.26 - Ensaio 1 para o estudo dos pontos críticos com pipetas volumétricas de 5 ml.....	82
Tabela 4.27 - Ensaio 2 para o estudo dos pontos críticos com pipetas volumétricas de 5 ml.....	83
Tabela 4.28 - Ensaio 3 para o estudo dos pontos críticos com pipetas volumétricas de 5 ml.....	83
Tabela 4.29 - Valores de condutividade obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por cloreto de sódio (dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele PG8583 CD 84	84
Tabela 4.30 - Valores de condutividade obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por cloreto de sódio (dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele PG8583 CD 84	84
Tabela 4.31 - Valores de condutividade obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por neodisher FLA (dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele PG8583 CD...	85
Tabela 4.32 - Valores de condutividade obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por neodisher FLA (dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele PG8583 CD...	85

Tabela 4.33 - Teores em sulfametoxazol obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por sulfametoxazol (Dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele PG 8583 CD	86
Tabela 4.34 - Teores em sulfametoxazol obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por sulfametoxazol (Dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele PG 8583 CD	86
Tabela 4.35 - Valores TOC obtidos do enxaguamento de material por contaminar e submetido à lavagem na máquina Miele G7733.....	87
Tabela 4.36 - Valores de TOC obtidos do enxaguamento de material contaminado com Labwash (Dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele G7733 .....	87
Tabela 4.37 - Valores de TOC obtidos do enxaguamento de material contaminado com Labwash (Dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele G7733 .....	88
Tabela 4.38 - Ensaio 1 para o estudo dos pontos críticos com frascos de 1000 ml.....	89
Tabela 4.39 - Ensaio 2 para o estudo dos pontos críticos com frascos de 1000 ml.....	89
Tabela 4.40 - Ensaio 3 para o estudo dos pontos críticos com frascos de 1000 ml.....	90
Tabela 4.41 - Ensaio 1 para o estudo dos pontos críticos com copos de polipropileno de 250 ml ..	90
Tabela 4.42 - Ensaio 2 para o estudo dos pontos críticos com copos de polipropileno de 250 ml ..	91
Tabela 4.43 - Ensaio 3 para o estudo dos pontos críticos com copos de polipropileno de 250 ml ..	91
Tabela 4.44 - Valores de condutividade obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por cloreto de sódio (dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele G7733 .....	92
Tabela 4.45 - Valores de condutividade obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por cloreto de sódio (dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele G7733 .....	92
Tabela 4.46 - Valores de condutividade obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por neodisher FLA (dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele G7733 .....	93
Tabela 4.47 - Valores de condutividade obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por neodisher FLA (dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele G7733 .....	94
Tabela 4.48 - Teores em sulfametoxazol obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por sulfametoxazol (dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele G7733.....	95
Tabela 4.49 - Quantificação do teor em sulfametoxazol obtido da água de enxaguamento do tubo de ensaio 3 .....	95
Tabela 4.50 - Teores em sulfametoxazol obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por sulfametoxazol (dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele G7733.....	96
Tabela 4.51 - Quantificação do teor em sulfametoxazol obtido da água de enxaguamento do copo de filtração(2).....	97
Tabela 4.52 - Resultados obtidos no estudo da gama de concentrações.....	103
Tabela 4.53 - Sinal-ruído e áreas obtidos das três injeções de cada solução .....	104
Tabela 4.54 - Áreas obtidas das injeções das soluções a 0,5, 1 e 1,5%.....	104
Tabela 4.55 - Valores utilizados para o cálculo dos limites de detecção e quantificação .....	105
Tabela 4.56 - Limites de detecção e quantificação .....	105
Tabela 4.57 - Taxa de recuperação a 50%.....	106
Tabela 4.58 - Taxa de recuperação a 100%.....	106
Tabela 4.59 - Taxa de recuperação a 150%.....	106
Tabela 4.60 - Resultados obtidos no ensaio da repetibilidade .....	107

Tabela 4.61 - Resultados obtidos pela analista 1, no dia 1 e no primeiro sistema cromatográfico (Waters 7).....	107
Tabela 4.62 - Resultados obtidos pela analista 1, no dia 2 e no segundo sistema cromatográfico (Waters 6).....	108
Tabela 4.63 - Resultados obtidos pela analista 2, no dia 1 e no primeiro sistema cromatográfico (Waters 7).....	108
Tabela 4.64 - Resultados obtidos pela analista 2, no dia 2 e no segundo sistema cromatográfico (Waters 6).....	108
Tabela 4.65 - Resultados obtidos das injeções da solução no sistema cromatográfico 1 (Waters 7) .....	109
Tabela 4.66 - Resultados obtidos das injeções da solução no sistema cromatográfico 2 (Waters 6) .....	109
Tabela 4.67 - Resultados obtidos para o ensaio 1.....	110
Tabela 4.68 - Resultados obtidos para o ensaio 2.....	110
Tabela 4.69 - Resultados obtidos para o ensaio 3.....	111
Tabela 4.70 - Resultados obtidos para o ensaio 4.....	111
Tabela 4.71 - Resultados obtidos para o ensaio 5.....	112
Tabela 4.72 - Resultados obtidos para o ensaio 6.....	112
Tabela 4.73 - Resultados obtidos para o ensaio 7.....	113
Tabela 4.74 - Resultados obtidos para o ensaio 8.....	113
Tabela 4.75 - Concentrações em sulfametoxazol obtidas em cada ensaio .....	114
Tabela 4.76 - Efeito produzido por cada fator .....	114
Tabela 4.77 - Resultados obtidos da estabilidade das soluções 0, 20 e 40 h após terem sido preparadas e guardadas à temperatura ambiente .....	115
Tabela 4.78 - Resultados obtidos da estabilidade das soluções 0 e 88 h após terem sido preparadas e guardadas a 5 °C.....	116



## Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

AIM	Autorização de Introdução no Mercado
BPF	Boas Práticas de Fabrico
CV	Coeficiente de Variação
DL50	Dose letal
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GMP	<i>Good Manufacturing Practices</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
IC	Carbono Inorgânico (do inglês <i>Inorganic Carbon</i> )
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
NPOC	Carbono Orgânico Não Purgado (do inglês, <i>Not Purged Organic Carbon</i> )
POC	Carbono Orgânico Purgado (do inglês, <i>Purged Organic Carbon</i> )
ppb	partes do bilhão
ppm	partes por milhão
QD	Qualificação de Design
QI	Qualificação de Instalação
QO	Qualificação de Operação
QP	Qualificação de Performance
RSD	Desvio Padrão Relativo (do inglês, <i>Relative Standard Deviation</i> )
SST	<i>System Suitability Tests</i> (Testes de adequabilidade do sistema)
TC	Carbono Total (do inglês, <i>Total Carbon</i> )
TOC	Carbono Orgânico Total (do inglês, <i>Total Organic Carbon</i> )



# **1. Introdução**

## **1.1 Enquadramento e motivação**

Com o objetivo de assegurar que os produtos se encontram dentro dos padrões de qualidade exigidos, os diversos ensaios de matérias primas, produto a granel e produto acabado são uma prática bastante comum na rotina laboratorial das indústrias farmacêuticas. Para realizar estes ensaios é necessário utilizar material de laboratório adequado que, por sua vez, tem de se apresentar limpo e dentro dos critérios de descontaminação aceitáveis. Como tal é de extrema importância garantir que os procedimentos de limpeza dos materiais estão a ser executados corretamente, ou seja, que as máquinas de lavar material apresentam a capacidade de retirar todas as partículas e substâncias contaminantes presentes no material.

Nesta dissertação de mestrado pretende-se realizar a qualificação da performance das máquinas de lavagem do material de laboratório do Controlo da Qualidade dos Laboratórios Vitória, por forma a garantir que estas funcionam de acordo com as especificações, eliminando quaisquer contaminações residuais que poderiam provocar interferências no material em questão.

A qualificação destes três equipamentos irá contribuir para o aumento da fiabilidade e confiança dos resultados obtidos nos ensaios desenvolvidos no setor.

## **1.2 Laboratórios Vitória, S. A.**

Os Laboratórios Vitória, S. A. são uma empresa farmacêutica portuguesa inserida no grupo FAES FARMA.

O primeiro laboratório nasceu em 1941 como forma de colmatar as necessidades existentes no mercado devido à segunda guerra mundial. Por sua vez, a sua ação iniciou-se apenas dois anos mais tarde, em 1943, assumindo desde logo uma posição de destaque no mercado devido à preparação de arsenicais trivalentes e pentavalentes que rapidamente se categorizaram e se tornaram substitutos de similares franceses e alemães. Nos anos seguintes foram lançados para o mercado outros produtos que tiveram uma larga expansão, como por exemplo o Venosmil (molécula Hidrosmína) em 1978.

Estes têm vindo a desenvolver acordos de licenciamentos com algumas das maiores multinacionais químico-farmacêuticas e os produtos comercializados vão desde anti-inflamatórios e antibióticos a antidepressivos, entre outros. A empresa alcançou notoriedade junto da classe profissional médica, sendo reconhecida pelos seus valores de rigor, qualidade e confiança, ocupando um lugar de destaque no sector farmacêutico nacional.

Atualmente centram a sua atividade na Investigação, Fabrico e Comercialização. Relativamente à investigação, nos Laboratórios Vitória existe uma forte colaboração com alguns Departamentos de Farmacologia de diversas Universidades, contando também com a cooperação de alguns Centros de Investigação.

A tecnologia avançada existente nas instalações fabris permite o fabrico especializado de formas farmacêuticas sólidas, líquidas e semi-sólidas, como:

- Comprimidos e cápsulas;
- Soluções orais (em frascos e ampolas);
- Soluções injetáveis de pequeno volume
- Supositórios e óvulos;
- Pomadas, géis e cremes.

Inovação, qualidade e garantia de eficácia são aspetos valorizados, fazendo dos Laboratórios Vitória uma empresa moderna com elevados padrões de rigor e qualidade [1].

A empresa fornece produtos para o mercado português e exporta para a FAES FARMA que, por sua vez, exporta para mercados externos. A sua área total é de 7660 m<sup>2</sup>, dividido em 4 edifícios. A área total superficial dos principais edifícios encontra-se dividida em:

Tabela 1.1 - Área ocupada por cada seção [2]

Secção	Área (m <sup>2</sup> )
Escritórios	2400
Armazém de materiais	1512
Armazém de produtos acabados	320
Produção	3020
Manutenção	270
Controlo e Garantia da Qualidade	300

Na União Europeia, a indústria farmacêutica necessita de manter elevados padrões de gestão da qualidade no desenvolvimento, fabrico e controlo dos produtos comercializados [3]. Como tal os Laboratórios Vitória seguem as regulamentações estabelecidas pelas boas práticas de fabrico – BPF.

## 2. Qualidade Farmacêutica

A qualidade é uma preocupação permanente na indústria farmacêutica, sendo de extrema importância cumprir e manter os elevados padrões da sua gestão nas fases de produção, desenvolvimento e distribuição de medicamentos.

De modo a garantir o cumprimento dos requisitos de segurança, qualidade e eficácia adotou-se um sistema de autorização de comercialização que assegura que todos os medicamentos são avaliados por uma autoridade competente. Este sistema garante que todos os produtos autorizados no mercado europeu são fabricados ou importados apenas por fabricantes autorizados, cujas atividades são regularmente inspecionadas [4].

Alguns medicamentos são comercializados de forma global, tornando-se assim difícil a harmonização mundial dos requisitos de qualidade. Foi com base nisto que se estabeleceu a ICH (*Internacional Council for Harmonization*), que tem como missão atingir a harmonização mundial, garantindo a segurança, eficiência e elevada qualidade dos medicamentos, através do uso mais económico de recursos humanos, animais e materiais [5]. A harmonia é atingida através da implementação das chamadas *ICH Guidelines*, que são normas que resultam do acordo científico entre entidades reguladoras e profissionais da indústria. As *guidelines* estão divididas em quatro categorias (Qualidade, Segurança, Eficiência e Multidisciplinaridade), sendo as referentes à qualidade aquelas que representam um maior interesse para este trabalho.

### 2.1 O Sistema de Qualidade Farmacêutica

O sistema de qualidade farmacêutica é constituído por um conjunto de normas regulamentais que visam verificar, gerir e garantir o controlo de tudo o que possa influenciar, direta ou indiretamente, a qualidade dos produtos farmacêuticos. Como tal, baseia-se nas normas ISO referentes à qualidade, incluindo a aplicação das boas práticas de fabrico (BPF). Este sistema pode ser implementado ao longo das diferentes etapas do ciclo de vida do produto, facilitando a inovação e fortalecendo a ligação entre o desenvolvimento farmacêutico e as atividades industriais. O sistema de qualidade farmacêutica deve garantir [6]:

- A implementação de um plano pré-definido para a conceção do produto, plano esse que vai sendo melhorado, promovendo a qualidade adequada do mesmo;
- Os medicamentos são desenvolvidos e produzidos segundo as Boas Práticas de Fabrico;
- Os resultados obtidos do produto e da monitorização do processo são tidos em consideração na libertação do lote e na investigação de desvios, como ação preventiva para evitar potenciais desvios que possam ocorrer no futuro;

- A melhoria contínua é facilitada através da implementação de melhorias da qualidade, apropriadas ao nível do processo decorrente e ao conhecimento que se tem sobre o produto;
- Após a implementação de qualquer mudança, deve ser realizada uma avaliação de forma a comprovar que os objetivos para a qualidade estão a ser cumpridos;
- Nenhum medicamento pode ser vendido ou fornecido sem que os requisitos de autorização de comercialização e produção estejam conformes e sem a aprovação do certificado do lote de produção;

É particularmente nesta área, farmacêutica, que a qualidade do produto final está diretamente relacionada com a saúde e segurança do consumidor, uma vez que se trata de medicamentos que servem para curar ou prevenir doenças. Como tal o controlo deve ser máximo e rigoroso e o produto o mais seguro possível [7].

### 2.1.1 Boas Práticas de Fabrico

As boas práticas de fabrico (BPF), do inglês *Good Manufacturing Practices* (GMP) são um conjunto de normas, aceites internacionalmente, que devem ser adotadas por parte das empresas, neste caso pelas indústrias farmacêuticas, de modo a garantir a qualidade em todo o processo de fabrico. Estas encontram-se descritas em “*EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use*” [8].

As BPF aplicam-se à produção e ao controlo da qualidade, e os seus requisitos básicos são os seguintes [9]:

- Todo o processo de fabrico é claramente definido e revisto periodicamente, de forma a verificar-se que os medicamentos produzidos correspondem às suas especificações;
- As etapas críticas e alterações ao processo devem ser validadas;
- Para a aplicação das boas práticas de fabrico é necessário:
  - Pessoal qualificado
  - Locais apropriados
  - Equipamentos, materiais e serviços
  - Armazenamento e meios de transporte adequados
  - Produtos, embalagens e etiquetas corretos
  - Procedimentos aprovados
- Instruções e procedimentos documentados com vocabulário claro e sem ambiguidade;
- Os operadores recebem formação para efetuarem os procedimentos de forma adequada;
- São recolhidas amostras, manualmente ou por meio de aparelhos específicos, que provam que todos os passos requeridos para o procedimento têm sido seguidos

efetivamente, demonstrando que o produto obtido está conforme as suas especificações. Qualquer desvio significativo é registado e estudado;

- Os registos de fabrico, incluindo a distribuição, são elaborados com vista a traçar o histórico completo de um lote e são escritos de forma clara e acessível;
- Deve existir um sistema que permita retirar ou substituir do mercado um lote de um produto, caso necessário;
- Reclamações referentes a produtos são investigadas, sendo tomadas medidas de modo a prevenir situações semelhantes no futuro.

### **2.1.2 Controlo da Qualidade**

O controlo da qualidade é parte das boas práticas de fabrico. Representa-se por um conjunto de operações que têm o objetivo de verificar e assegurar que os produtos estão dentro dos padrões de qualidade exigidos, podendo assim ser lançados para o mercado. Neste setor são realizadas técnicas de amostragens, especificações e ensaios para matérias-primas, materiais de embalagem, produtos intermédios, produto a granel e produto acabado.

Efetua-se também a organização, documentação e procedimentos que asseguram que nenhuma das matérias-primas a utilizar no fabrico e que nenhum dos medicamentos aprovados para venda ou distribuição serão libertados, até que a sua qualidade seja considerada satisfatória [9].

### **2.1.3 Garantia da Qualidade**

A garantia da qualidade é um conceito muito amplo, na medida em que engloba todos os conteúdos que influenciam, individual ou coletivamente, a qualidade do produto. Considera-se como um conjunto de procedimentos que assegura que os medicamentos têm a qualidade exigida para o fim a que se destinam. O departamento é responsável por fazer cumprir as boas práticas de fabrico [9].

## **2.2 Legislação Farmacêutica**

Na indústria farmacêutica, amplamente regulamentada, todas as atividades realizadas necessitam de cumprir certas normas estabelecidas internacionalmente, de forma a garantir a qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos comercializados.

Dentro da Europa, a EMA (*European Medicines Agency*) é a agência responsável pela avaliação científica, supervisão e monitorização de segurança dos medicamentos produzidos nas unidades industriais. Esta protege a saúde pública e animal de cerca de 28 estados membros da União Europeia [10].

Relativamente a Portugal, a entidade responsável por regular e supervisionar os sectores dos medicamentos, dispositivos médicos e cosméticos, e garantir que os profissionais de saúde têm acesso aos mesmos é o INFARMED, Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P. As principais competências do INFARMED baseiam-se em [11]:

- Contribuir para a formulação da política de saúde, nomeadamente políticas dos medicamentos de uso humano e produtos de saúde;
- Regulamentar, avaliar, autorizar, disciplinar, fiscalizar, verificar analiticamente, como laboratório de referência, e assegurar a vigilância e controlo da investigação, produção, distribuição, comercialização e utilização dos medicamentos e produtos de saúde;
- Assegurar a regulação e supervisão das atividades de investigação, produção, distribuição, comercialização e utilização de medicamentos de uso humano e dos produtos de saúde;
- Garantir a qualidade, segurança, eficácia e custo-efetividade dos medicamentos de uso humano e dos produtos de saúde;
- Assegurar a adequada integração e participação no âmbito do sistema da União Europeia relativo à avaliação e supervisão de medicamentos de uso humano, incluindo a articulação com a Agência Europeia de Medicamentos, a Comissão Europeia e outras tantas instituições.

A Farmacopeia Portuguesa refere-se a um documento oficial que engloba um conjunto de normas e métodos que permitem a garantia da qualidade dos medicamentos, de uso humano e veterinário, estabelecendo também os requisitos a que devem obedecer os fármacos, matérias-primas, substâncias de uso farmacêutico e métodos analíticos usados em Portugal. Destina-se a farmácias, fabricantes, distribuidores e laboratórios de controlo, sendo que compete à Comissão da Farmacopeia Portuguesa, órgão consultivo do INFARMED, a sua elaboração, revisão e atualização [12].

Um medicamento antes de entrar em circulação necessita de autorização de introdução no mercado (AIM) por parte do INFARMED. A organização necessita também de autorizar as modificações que o medicamento vai sofrendo ao longo do tempo, de modo a que este se mantenha atualizado - Alterações aos termos da AIM. Todo este sistema de autorização e manutenção de um medicamento no mercado pode funcionar apenas a nível nacional, ou pode ser feito de forma concertada com os outros estados-membros da União Europeia. Estes procedimentos concertados entre os estados-membros constituem o que se chama de sistema europeu de avaliação de medicamentos.



Nos Estados Unidos da América, cada produto antes de ser lançado para o mercado, é submetido a testes, sendo aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*). Este órgão do governo controla os medicamentos e alimentos através de diversos testes e pesquisas [13].

## 2.3 Limpeza na Indústria Farmacêutica

Na indústria farmacêutica, a limpeza é realizada de modo a remover materiais contaminantes de produtos e não produtos. Uma limpeza ineficiente pode levar a produtos adulterados, podendo originar consequências muito graves. Como tal uma limpeza eficiente é a chave para garantir a qualidade do produto em causa.

Praticamente todas as etapas de fabrico de um medicamento envolvem processos de limpeza, desde as etapas de produção a granel até à colocação na embalagem.

### 2.3.1 Contaminação na indústria farmacêutica

Contaminação é definida como a presença, no produto de interesse, de material que não devia estar presente e que não é tido na formulação como um dos ingredientes. Com base nesta definição, e tendo em conta que um dos principais objetivos, neste tipo de indústria, é a minimização da contaminação dos produtos, torna-se conveniente referir como essa contaminação pode ocorrer [14].

Existem diferentes tipos de contaminação, de entre os quais se destacam os seguintes:

- Contaminação por atividade microbiana

Um sério problema de contaminação resulta da presença microbiana. A potencialidade da contaminação poder ser desenvolvida a qualquer momento, mesmo depois da limpeza ter sido considerada eficaz, é grande. O principal fator causador do crescimento microbiológico é existência de um ambiente húmido, que fornece o meio adequado ao crescimento das bactérias [14].

- Contaminação cruzada (Substâncias ativas)

A contaminação cruzada, do inglês *cross contamination*, consiste na contaminação de determinada matéria-prima, produto intermédio, produto a granel ou produto terminado por outra matéria-prima, produto intermédio, produto a granel ou produto terminado, quando estes são produzidos no mesmo equipamento ou contactam os mesmos equipamentos durante o processo de fabrico [15]. O principal problema da contaminação cruzada por substância ativa reside no facto do produto passar a ser constituído por múltiplas substâncias ativas e não apenas por um. Como resultado da contaminação, a ação da substância ativa pode ser aumentada (efeito sinérgico),

reduzida ou inibida (efeito antagonístico), ou pode ter um comportamento completamente diferente do esperado [14].

- Contaminação por agentes de limpeza

Por vezes, na indústria farmacêutica, existe a necessidade de utilizar agentes de limpeza tóxicos nas operações de remoção de resíduos mais difíceis. No entanto, estes agentes representam uma ameaça potencial como contaminantes. Uma forma de resolver este problema consiste na utilização de agentes de limpeza com baixa toxicidade, mas com a capacidade de remover os contaminantes de igual forma à atuação de um agente mais tóxico, garantindo uma limpeza eficiente [14].

- Contaminação por materiais diversos

Da mesma forma que existem alguns contaminantes espectáveis na indústria farmacêutica, também existem outros não tão usuais que podem afetar as operações, contaminando consequentemente os produtos. Exemplos disso são excipientes, filamentos de escovas, filtros de papel, fragmentos das luvas de borracha, materiais utilizados na limpeza dos equipamentos (fibras de algodão de panos), pedaços de metais, entre muitos outros [14].

### **2.3.2 Agentes e mecanismos de limpeza**

A limpeza de material de laboratório é muitas vezes uma etapa negligenciada ou deixada um pouco de lado nos procedimentos de rotina laboratorial. Porém, trata-se de uma etapa que se encontra entre as mais importantes e determinantes. Uma lavagem correta do material implica uma maior confiança nos resultados obtidos de ensaios analíticos, uma vez que podem ser evitadas contaminações com substâncias, partículas, solventes, etc [16].

Os agentes de limpeza também apresentam um papel fulcral nos procedimentos de limpeza. Estes devem ser capazes de remover todo o tipo de sujidade sem deixar nenhum resíduo. Nos procedimentos de limpeza é comum a utilização de água, não necessariamente como agente de limpeza, mas como dissolvente. O seu baixo custo, o facto de não apresentar toxicidade e a inexistência de resíduos após o enxaguamento são algumas das vantagens da sua utilização. Normalmente, à água adicionam-se aditivos (como detergentes) de modo a facilitar e aumentar a eficácia da limpeza.

O uso de detergentes também apresenta algumas desvantagens, principalmente a contaminação por resíduos, a fonte de toxicidade e o aparecimento de novos produtos químicos, o que implica uma maior atenção relacionada com a decomposição destes quando se efetuam procedimentos de limpeza [17].

### **2.3.3 Análise de risco e identificação do pior caso**

Quando se realiza um processo de validação de limpeza de equipamentos ou validação de limpeza de material, a análise de risco e identificação do pior caso são dos primeiros passos a serem efetuados.

A escolha do pior caso visa reduzir os trabalhos de validação, uma vez que seria moroso validar a limpeza para todos os produtos de interesse. Assim, o produto que apresentar as piores características a nível de limpeza é considerado o pior caso, e a sua seleção é baseada nos seguintes parâmetros:

- Toxicidade
- Solubilidade da substância ativa em água
- Concentração da substância ativa na formulação do produto

Aquando da aprovação da validação para o pior caso assume-se que os outros produtos também estarão validados [18].

### **2.3.4 Identificação dos pontos críticos**

Os pontos críticos de um equipamento são os locais que apresentam maior dificuldade de limpeza. No caso das máquinas de lavar material, o conhecimento destes pontos permite ter uma melhor percepção do funcionamento das mesmas e dos locais onde a lavagem não é tão eficiente. A dificuldade de limpeza associada às máquinas de lavar pode estar relacionada com diversos fatores, como o formato do equipamento, características dos materiais submetidos à lavagem e tipo de substância que se encontra no material.

## **2.4 Validação e Qualificação**

Segundo a FDA, a validação de processo refere-se a uma evidência documentada que assegura, com elevado grau de confiança, que um determinado processo irá originar produtos de forma consistente, cumprindo assim as especificações pré-definidas e características de qualidade [19]. Assim sendo, a validação vai comprovar que um determinado processo consegue originar consistentemente resultados confiáveis, atestando a sua reprodutibilidade [20].

Como parte integrante da garantia da qualidade, a validação envolve o estudo sistemático de sistemas e processos com o objetivo de determinar se estes executam as funções pretendidas de forma adequada. É necessário ter em conta que a validação, por si só, não melhora um processo, mas comprova que o mesmo foi desenvolvido corretamente e que se encontra sob controlo [21].

Quando esta abordagem se refere a uma máquina ou a um equipamento então fala-se em qualificação. A qualificação é um conjunto de atividades que verifica e evidencia, documentalmente, que um sistema ou equipamento foi concebido, está instalado e funciona de acordo com as especificações pré-estabelecidas [22]. A validação incorpora o conceito de qualificação.

### 2.4.1 Tipos de validação

Dependendo da etapa no ciclo de vida do produto em que se situa, a validação é caracterizada por ser de dois tipos [21]:

- **Validação prospetiva** - é realizada durante a fase de desenvolvimento do produto, através da análise dos riscos do processo de fabricação.
- **Validação concorrente** - é realizada durante a rotina de produção, podendo esta não estar concluída aquando da venda dos produtos.

### 2.4.2 Etapas de uma validação

A validação de processo envolve uma série de fases que ocorrem ao longo do ciclo de vida do produto e processo. As atividades relacionadas com os estudos de validação agrupam-se assim em três etapas:

- Design do processo** – o processo de fabricação é estabelecido durante esta etapa com base no conhecimento adquirido durante a fase de investigação e desenvolvimento como também nas atividades de *scale-up*. É nesta etapa que se efetuam diversas atividades, como a formulação do produto, estudos em lotes piloto e a sua deslocação para a escala comercial e o estabelecimento das condições de estabilidade [19].
- Processo de qualificação** - Nesta etapa, o design do processo é avaliado de modo a determinar se a manufatura comercial, no processo, é reprodutível. Confirma se todos os limites estabelecidos são válidos e garante que os produtos podem ser produzidos até nas condições definidas como o “pior caso”. Envolve a qualificação de *design* (QD), instalação (QI), operação (QO) e desempenho/performance (QP) [19].

#### Etapas da qualificação

Uma qualificação é constituída pelas atividades que permitem certificar e documentar que quaisquer instalações, sistemas e equipamentos se encontram devidamente instalados e/ou funcionam corretamente, produzindo os resultados esperados. A qualificação é uma parte da

validação, mas as etapas individuais de qualificação não constituem, por si só, uma validação de processo.

Na figura 2.1 é apresentada uma representação esquemática das diferentes etapas da qualificação de um processo. A pirâmide é a melhor forma de planejar um processo de qualificação, isto é, se for investido mais tempo durante o início do projeto (qualificação de design), as próximas etapas (qualificação de instalação, de operação e de performance), irão certamente requerer menos tempo e menos custos associados [14].



Figura 2.1 - Etapas de uma qualificação (Adaptado de [14])

Uma qualificação é constituída, como foi referido anteriormente, por quatro etapas [15]:

- Qualificação de *Design*: Consiste na verificação de que o equipamento ou sistema apresenta um desempenho consistente e reproduzível, de acordo com as especificações definidas, por longos períodos de tempo.
- Qualificação de Instalação: É o conjunto de operações realizadas para certificar que as instalações (como equipamentos, infraestrutura, instrumentos de medição, utilidades e áreas de fabricação) presentes nos processos produtivos, estão selecionadas e instaladas apropriadamente e em concordância com as especificações estabelecidas.
- Qualificação de Operação: conjunto de operações que estabelece, sob determinadas condições, que o sistema opera conforme o previsto, em todas as faixas operacionais consideradas. É necessário que todos os aparelhos utilizados nestes testes estejam devidamente identificados e calibrados.
- Qualificação de *Performance*: Permite comprovar que as instalações, sistemas de suporte, utilidades, equipamentos e processos foram desenvolvidos de acordo com os requisitos das Boas Práticas de Fabrico.

- iii. **Verificação contínua do processo** – Assegura que o processo permanece num estado de controlo durante a rotina de produção.

### 2.4.3 Validação de métodos analíticos

A validação de um método analítico é um processo que pretende comprovar que um procedimento analítico proporciona, com elevado grau de segurança, a obtenção de resultados precisos e exatos, dentro das especificações e dos atributos de qualidade pré-estabelecidos. O facto de se trabalhar com um método validado, que assegura resultados seguros, permite a minimização do número de falhas e repetições. Este tipo de validação aplica-se usualmente a quatro tipos de ensaios realizados em laboratório, como [23]:

- Ensaios de identificação;
- Ensaios para a determinação de um analito de interesse de uma matéria-prima ou das especialidades farmacêuticas produzidas: doseamento de substâncias ativas, conservantes e impurezas;
- Ensaios para a determinação de características farmacotécnicas intrínsecas (ex: ensaios de dissolução);
- Ensaios limites de impurezas e de quantificação de impurezas.

Entre as situações que exigem a validação ou revalidação, podemos destacar: a colocação de um novo método em uso, algumas mudanças que tenham sido efetuadas no método, a indicação, pela parte do controlo de qualidade, de que um método estabelecido tem vindo sofrer alterações com o tempo, alterações na formulação dos produtos ou ainda a necessidade de demonstrar a equivalência entre dois métodos (um novo método e um método já implementado).

Segundo a *Guideline “ICH-Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)”*, os parâmetros a que um método deve obedecer para ser considerado válido são os seguintes: Seletividade, Linearidade, Precisão, Exatidão, Gama de Trabalho, Limite de Detecção, Limite de Quantificação e Robustez.

A avaliação de uns ou outros parâmetros depende do tipo de método analítico que se quer validar, como se demonstra na tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Características estudadas dependendo do tipo de procedimento analítico que se pretende [24],[25]

Parâmetro	Identificação	Impurezas		Doseamento
		Quantificação	Limite	
<b>Seletividade</b>	Sim	Sim	Sim	Sim
<b>Linearidade</b>	Não	Sim	Não	Sim
<b>Precisão:</b>				
<b>Repetibilidade</b>	Não	Sim	Não	Sim
<b>Precisão intermédia</b>	Não	Sim	Não	Sim
<b>Exatidão</b>	Não	Sim	Não	Sim
<b>Gama de trabalho</b>	Não	Sim	Não	Sim
<b>Limite de deteção</b>	Não	Não	Sim	Não
<b>Limite de quantificação</b>	Não	Sim	Não	Não
<b>Robustez</b>	Não	Sim	Não	Sim

Para este trabalho em específico foi também avaliada a adequabilidade do sistema e a estabilidade das soluções.

#### 2.4.3.1 Parâmetros da validação de métodos analíticos

##### Seletividade

A seletividade ou especificidade corresponde à capacidade de um método analítico para identificar simultânea ou separadamente os analitos de interesse, de forma inequívoca, em presença de outras substâncias químicas que podem estar presentes na amostra. Um método é considerado seletivo quando possibilita a medida de uma ou de várias substâncias específicas, presentes na amostra estudada, sem a interferência de outras substâncias (como excipientes, produtos de degradação ou impurezas) presentes na matriz complexa [23].

##### **CrITÉRIOS de aceitação**

- ✓ A resolução entre picos vizinhos deverá ser  $\geq 1,5$ .

##### Linearidade

À capacidade do método para originar resultados que são diretamente proporcionais à concentração da substância ativa na amostra, numa dada faixa de aplicação, dá-se o nome de linearidade. Para este ensaio devem ser estudados, no mínimo, 5 níveis de concentração e o método apenas ficará válido para a gama de concentrações estudada [24]. A avaliação é realizada através

de uma regressão linear, representada graficamente, estando no eixo das abcissas as concentrações e no eixo das ordenadas as respectivas áreas dos picos. A comprovação da linearidade é obtida através do coeficiente de correlação ( $r$ ) da equação da curva de calibração obtida, que deve ser próximo de 1 de modo a garantir o ajuste dos dados obtidos.

### **Critérios de aceitação**

- ✓ O coeficiente de determinação ( $r^2$ )  $\geq 0,999$
- ✓ Para testar a homogeneidade das variâncias (teste de *Cochran*):  
$$G_{EXP} < G_{TAB}$$
- ✓ Para a análise de variâncias (ANOVA), no estudo da normalidade dos residuais:  
$$F1_{EXP} > F1_{TAB}, \text{ demonstra a existência de um declive diferente de zero}$$
$$F2_{EXP} < F2_{TAB}, \text{ a dispersão deve-se somente a erros de ordem experimental}$$
- ✓ Para o cálculo de  $t$  e intervalos de confiança (verificação da ordenada na origem e do declive)
- ✓ A verificação do declive ou da linearidade cumpre com o teste de  $t$  se:  
$$t_{EXP} > t_{TAB}, \text{ e}$$

O intervalo de confiança não deve incluir o valor zero.
- ✓ A verificação da variável independente ou de proporcionalidade cumpre com o teste de  $t$  se:  
$$t_{EXP} < t_{TAB}, \text{ e;}$$

O intervalo de confiança incluir o valor zero.

Os valores de  $G_{TAB}$ ,  $F_{TAB}$  e  $t_{TAB}$  são obtidos pela análise das tabelas do Teste de Cochran, Teste de Fisher-Snedecor e Teste  $t$  de Student, respetivamente.

Todos estes testes estatísticos encontram-se desenvolvidos no tópico 2.6

### **Precisão**

A precisão de um procedimento analítico reflete o grau de concordância entre uma série de resultados, obtidos por aplicações sucessivas do método a múltiplas tomas de uma amostra única e homogénea, sendo expressa como Coeficiente de Variação (CV) (também denominado por Desvio Padrão Relativo - RSD) [24]:



$$s = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{\sum_{i=1}^n (xi - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

Equação 2.1 – Cálculo do desvio padrão

$$CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Equação 2.2 – Cálculo do coeficiente de variação

Onde s é o desvio padrão e  $\bar{x}$  a média aritmética.

A precisão é determinada em três níveis: **repetibilidade**, **precisão intermediária** e **reprodutibilidade**.

**Repetibilidade** – Estuda a variabilidade efetuando uma série de análises sobre a mesma amostra, nas mesmas condições operativas (pelo mesmo analista, com os mesmos equipamentos e reagentes), no mesmo laboratório, num intervalo de tempo curto.

#### **Critérios de aceitação**

- ✓ Os resultados do doseamento deverão ter um RSD  $\leq 2\%$

**Precisão intermédia** – Estuda a variabilidade efetuando uma série de análises sobre a mesma amostra, no mesmo laboratório, mas em condições operativas diferentes, isto é, diferentes analistas, equipamentos e dias.

#### **Critérios de aceitação**

- ✓ Os resultados do doseamento deverão ter um RSD  $\leq 2\%$

**Reprodutibilidade** – Expressa a variabilidade entre laboratórios, tendo como principal objetivo verificar que o método reproduz os mesmos resultados quando é executado em diferentes laboratórios. O estudo deste parâmetro na validação de método é útil quando vão ser efetuados estudos colaborativos entre laboratórios.

Neste trabalho a reprodutibilidade não é um parâmetro estudado.

#### **Exatidão**

A exatidão de um procedimento analítico indica a proximidade entre o valor aceite convencionalmente como o valor verdadeiro (valor de referência ou valor nominal) e o valor

experimental encontrado (concentração determinada). Esta é expressa em percentagem de recuperação (TR) [24]:

$$TR(\%) = \frac{\text{Resultado recuperado}}{\text{Concentração nominal}} \times 100$$

Equação 2.3 - Cálculo da taxa de recuperação

### **Critérios de aceitação**

- ✓ Calcular a taxa de recuperação:  
Limite: 98% a 102% de taxa média de recuperação.
- ✓ O fator de concentração não influencia os resultados se através do teste de *Cochran* o  $G_{EXP} < G_{TAB}$ ;
- ✓ O RSD da taxa de recuperação deve ser no máximo 2%.

### **Gama de trabalho**

Também denominada por gama de concentrações de um procedimento analítico, é o intervalo entre a concentração mais baixa e mais alta de analito na amostra para o qual se demonstrou que o método analítico tem níveis de precisão, exatidão e linearidade adequados.

### **Critérios de aceitação**

- ✓ A gama será definida como o intervalo de concentrações obtido de acordo com o definido acima para a linearidade e para a exatidão e com um  $RSD \leq 3\%$ .

### **Limite de quantificação e deteção**

Entende-se por limite de quantificação de um dado método, a quantidade mínima de analito presente na amostra que se pode quantificar com uma adequada precisão e exatidão. Já o limite de deteção é a quantidade mínima de analito de uma amostra que se pode detetar e não necessariamente quantificar com um valor exato, de acordo com as condições experimentais. Segundo a Associação Espanhola de Farmacêuticos da Indústria (A.E.F.I.) a determinação destes limites pode basear-se na avaliação visual, na relação sinal-ruído, no desvio-padrão da resposta do branco e do declive da reta de calibração e na extrapolação da reta de calibração a concentração zero. Este último método é ainda classificado em outros dois: Métodos instrumentais que corrigem o sinal frente a um branco e métodos que não o corrigem.

Tendo por base a **avaliação visual**, o LD é determinado através da análise de amostras com concentrações conhecidas e decrescentes de analito, estabelecendo-se visualmente a

concentração mínima detetável assim como a concentração limite que permite quantificar com razoável precisão e exatidão o sinal obtido [26].

A avaliação com base na **razão sinal-ruído** é apenas aplicável a procedimentos analíticos que apresentem ruído na linha de base. A razão sinal-ruído determina-se através da comparação de sinais que provêm de uma amostra com baixa concentração de analito com um branco, de modo a estabelecer-se qual a concentração mínima a partir da qual pode ser detetado o analito. Uma razão sinal/ruído entre 3 e 2:1 é considerada aceitável para estimativa do limite de detecção [24].

Nos métodos baseados no **desvio-padrão da resposta do branco e do declive da reta de calibração** o limite de detecção é calculado a partir do conhecimento do desvio padrão atribuído à resposta de uma amostra placebo e do declive da reta de calibração do analito [26].

- **Aplicando a correção do sinal frente a um branco**

$$C_L = \frac{K \times s_{bl}}{b}$$

Equação 2.4 – Cálculo dos limites de detecção e quantificação

Sendo:  $C_L$  – Concentração do analito no LD (limite de detecção) ou LQ (limite de quantificação) (%)

$K$  – Constante que normalmente se considera igual a 3 para o LD e igual a 10 para o LQ

$S_{bl}$  – Corresponde à ordenada na origem da reta resultante da representação gráfica dos resíduos em função das concentrações estudadas

$B$  - Declive da reta de regressão linear obtida para a linearidade na gama que se supõe vizinha do LD

- **Não aplicando a correção do sinal frente a um branco**

$$C_L = \frac{Y_{bl} + (K \times s_{bl})}{b * \sqrt{n}}$$

Equação 2.5 – Cálculo dos limites de detecção e quantificação

Onde,  $n$  representa o número de réplicas e  $Y_{bl}$  o ruído de fundo do sistema.

Se o método realiza a leitura das amostras em duplicado ou triplicado, melhorando a precisão então é necessário introduzir na fórmula as repetições efetuadas.

O método baseado na **extrapolação da reta de calibração a concentração zero** consiste em efetuar uma reta de calibração com três níveis de concentração que se espera que estejam perto do limite de quantificação. O cálculo do limite de detecção e de quantificação efetua-se aplicando a equação 2.5 mencionada no método anterior. O valor de  $Y_{bl}$  obtém-se extrapolando a equação da reta a concentração zero (ordenada na origem da reta obtida). Para o cálculo do valor de  $s_{bl}$  é necessário produzir um gráfico do desvio padrão das respostas  $y$  (neste caso o desvio padrão das áreas) em função das concentrações estudadas. A ordenada na origem da reta obtida corresponde

ao valor de  $s_{bl}$ . Uma vez calculados estes valores é possível obter os limites de detecção e quantificação aplicando a equação 2.5, com  $K=3$  para o LD e  $K=10$  para o LQ.

#### **Critérios de aceitação**

- ✓ O sinal-ruído deverá ser  $\geq 3$  para o pico de interesse
- ✓ O RDS das injeções efetuadas deverá ser  $\leq 15\%$

#### **Adequabilidade do sistema – SST (System suitability tests)**

O estudo da adequabilidade do sistema é realizado através de um conjunto de ensaios que pretendem comprovar que o sistema cromatográfico é adequado ao fim a que se destina, isto é, o principal objetivo é demonstrar que o sistema se encontra em perfeitas condições para a realização do ensaio e que se mantém em funcionamento sem a perda das características analíticas. Como tal, são avaliados os parâmetros fator de capacidade ( $k$ ), número de pratos teóricos ( $N$ ), fator de simetria ( $T$ ) e a resolução entre picos ( $R_s$ ) [23].

O fator de capacidade ( $k'$ ) representa o volume de fase móvel necessária para eluir um composto. O número de pratos teóricos ( $N$ ) expressa o número de picos que podem aparecer no cromatograma por unidade de tempo. O fator de simetria ( $T$ ) determina a assimetria do pico. E por fim, a resolução entre picos ( $R_s$ ) mede a separação entre dois picos.

#### **Critérios de aceitação**

- ✓ A resolução entre qualquer pico potencialmente interferente e o pico de interesse deve ser  $\geq 1,5$ ;
- ✓ O número de pratos teóricos ( $N$ ) deverá ser preferencialmente  $\geq 2000$ ;
- ✓ O fator de capacidade ( $k$ ) deverá ser  $\geq 2$ ;
- ✓ O fator de simetria deverá situar-se entre 0,8 e 1,5;
- ✓ O RSD das injeções da solução padrão deverá ser  $\leq 2$ .

Os limites estabelecidos estão de acordo com as recomendações da FDA [27].

#### **Estabilidade das soluções**

A estabilidade das soluções refere-se à capacidade que um método analítico possui para comprovar que as soluções se mantêm inalteradas durante o tempo em que são submetidas ao estudo, fornecendo resultados confiáveis, reprodutíveis e estáveis por um período razoável de tempo

(dias, semanas ou meses, dependendo da necessidade). Este estudo é crucial para o caso de ocorrer algum atraso durante a realização da validação, de forma a não influenciar os resultados.

Para o estudo de estabilidade é importante ter em conta os parâmetros tempo e temperatura. Se uma solução não for estável à temperatura ambiente então a diminuição da temperatura vai favorecer a estabilidade. Em relação ao tempo, algumas soluções têm de ser preparadas e utilizadas apenas num curto período de tempo, apesar de ser desejável que a sua estabilidade se mantivesse por dias ou meses [28].

### **CrITÉrios de aceitação**

- ✓ O desvio entre a concentração final e a concentração inicial deverá ser  $\leq 2\%$

### **Robustez**

A robustez é a capacidade que um dado método apresenta para permanecer inalterado através da introdução deliberada de pequenas variações nos parâmetros experimentais, fornecendo igualmente uma indicação da confiança do sistema durante o uso normal. Os parâmetros que podem sofrer essas variações, no caso da técnica utilizada ser HPLC, são: pH da fase móvel, temperatura da coluna, volume de injeção, percentagem de componente orgânico na fase móvel, detecção eletroquímica (variação do comprimento de onda - UV), fluxo e tipo de coluna utilizada (diferentes fabricantes, lotes ou antiguidade da mesma). Como exemplo da variação aos parâmetros analíticos, segundo a Farmacopeia Europeia, podemos ter [29]:

- pH do componente aquoso da fase móvel:  $\pm 0,2$ ;
- Temperatura da coluna:  $\pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , quando a temperatura é especificada;
- Fluxo:  $\pm 50\%$ .
- Dimensões da coluna:
  - Comprimento da coluna:  $\pm 70\%$ ;
  - Diâmetro interno da coluna:  $\pm 25\%$ ;
  - Dimensão da partícula: redução máxima de 50%, não sendo permitido qualquer aumento;
- Composição da fase móvel: a quantidade do solvente minoritário pode ser ajustada entre  $\pm 30\%$  em valor relativo e  $\pm 2\%$  em valor absoluto, independentemente de qual dos dois for o maior (pode sempre ser efetuado qualquer um dos ajustes). Os outros componentes não podem ser alterados em mais de 10%, em valor absoluto.

A forma mais eficaz de estudar a robustez é através da realização de desenhos fatoriais. Desta forma, sem ser necessário realizar todas as combinações possíveis, pode concluir-se, com um número razoável de experiências, quais as variáveis que mais influenciam o resultado. Normalmente

os desenhos fatoriais que se utilizam são os desenhos fatoriais completos e fracionados e os desenhos de *Plackett-Burman* e *Youden-Steiner* [26].

Os desenhos de *Plackett-Burman* são os mais utilizados. Estes permitem avaliar a influência de diversos fatores a dois níveis de significância - nível alto (+) e nível baixo (-), com  $N=f+1$  experiências, sem ter em conta as possíveis interações combinadas entre eles. N representa o número de ensaios e f o número de fatores estudados.

Para gerar a matriz que permite construir o desenho fatorial é apenas necessário conhecer a distribuição da primeira coluna. Para 8 ensaios a primeira coluna é a seguinte:

Ensaio	Nível
1	+
2	+
3	+
4	-
5	+
6	-
7	-
8	-

Figura 2.2 - Primeira coluna num desenho fatorial para N=8 [26]

A segunda coluna é obtida a partir da primeira, colocando-se o último elemento da coluna anterior na primeira posição desta e movendo-se os elementos de cada linha para baixo uma posição, e assim consecutivamente para as restantes colunas. A última linha da tabela é constituída apenas por níveis baixos, completando assim o planeamento.

Fator Ensaio	A	B	C	D	E	F	G
1	+	-	-	+	+	-	+
2	+	+	-	-	-	+	+
3	+	+	+	-	+	-	-
4	-	+	+	+	-	-	+
5	+	-	+	+	-	+	-
6	-	+	-	+	+	+	-
7	-	-	+	-	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-

Figura 2.3 - Matriz usada num desenho fatorial de 7 fatores com 8 experiências [26]

Para a avaliação estatística dos resultados efetua-se o cálculo do efeito de cada fator:

$$Ex = \frac{\sum Y(+)}{n/2} - \frac{\sum Y(-)}{n/2}$$

Equação 2.6 – Cálculo do efeito de um fator x [26].

Onde:

$E_x$  = efeito do fator x

$\Sigma Y (+)$  = somatório dos resultados obtidos para o fator x no nível alto do intervalo definido

$\Sigma Y (-)$  = somatório dos resultados obtidos para o fator x no nível baixo do intervalo definido

n = nº total de ensaios

### **Critérios de aceitação**

- ✓ A percentagem de influência exercida por cada fator deverá ser o mais baixa possível. Quanto maior a percentagem de influência de um fator mais significativa será qualquer pequena alteração desse mesmo fator.

## **2.5 Metodologia Analítica**

Um método analítico consiste num conjunto de procedimentos que explicam detalhadamente todas as operações necessárias para efetuar uma análise em concreto, envolvendo técnicas laboratoriais criteriosamente desenvolvidas e planeadas. Para tal, é necessário que o método seja o mais adequado e fiável possível.

Na pesquisa de resíduos químicos, a escolha do método analítico a aplicar depende essencialmente da natureza química do resíduo, isto é, se este é orgânico ou inorgânico, solúvel em água ou noutros solventes, entre outros aspetos. Podem ser utilizados métodos específicos ou não específicos, dependendo da necessidade de detetar apenas um resíduo ou uma variedade deles. Os métodos específicos incluem os métodos cromatográficos, como por exemplo a cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC e a cromatografia gasosa – GC, por sua vez, como exemplos de métodos não específicos tem-se a condutimetria, potenciometria, carbono orgânico total - TOC e espectrofotometria no ultravioleta - UV [30].

Neste trabalho vão ser utilizados dois métodos analíticos não específicos (Carbono orgânico total e Condutimetria) e um método específico (Cromatografia líquida de alta eficiência).

### **2.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-UV)**

Os métodos de separação representam normalmente uma parte essencial dos ensaios efetuados em laboratórios físico-químicos e, a cromatografia líquida é, sem dúvida, uma das técnicas separativas mais importantes em química analítica. Este conceito foi definido no início de 1900 através do trabalho efetuado pelo botânico russo *Mikhail Tswett*. Os seus estudos centravam-se em

separar compostos (pigmentos de folhas) extraídos de plantas, usando um solvente que percorria uma coluna empacotada com partículas de carbonato de cálcio.

A cromatografia líquida é uma técnica de separação cromatográfica que se baseia na migração diferencial dos componentes de uma mistura devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis. Uma delas é a fase estacionária e encontra-se inserida numa coluna, a outra é a fase móvel, líquida, que atravessa a fase estacionária. Tendo por base a definição anterior, a cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) é o tipo de cromatografia que emprega o uso da fase móvel líquida e da fase estacionária (coluna empacotada com partículas de diâmetro da ordem de 3 a 10  $\mu\text{m}$ ) e que, para ter um fluxo razoável, opera a pressões elevadas. Trata-se de uma ferramenta muito utilizada e apresenta a capacidade de identificar, separar e quantificar todos os componentes que se encontram presentes numa solução. Atualmente, até mesmo componentes na ordem dos ppt (partes por trilhão) podem ser facilmente identificados por este método [31], [29]. A constituição do sistema de HPLC é apresentada na figura 2.4.

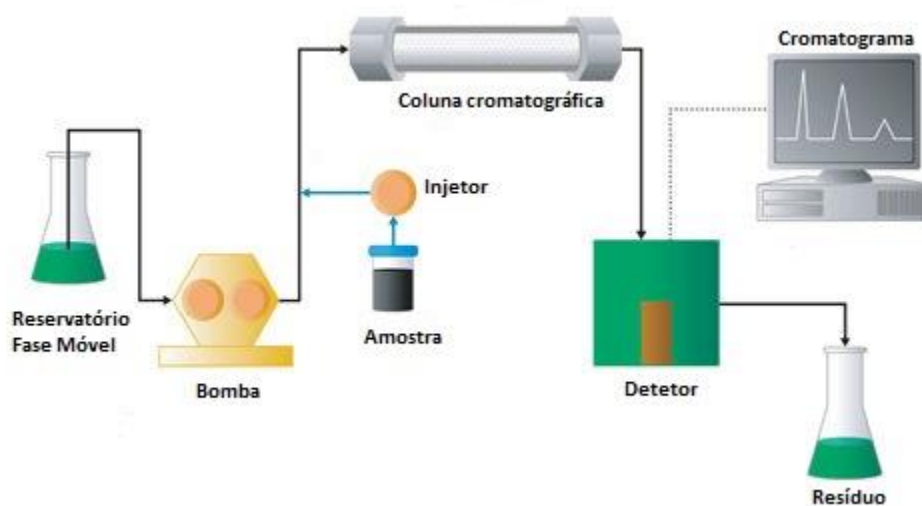


Figura 2.4 - Percurso efetuado pela fase móvel no sistema de HPLC (Adaptado de [31])

A fase móvel é armazenada num reservatório para posteriormente percorrer todo o sistema através da ação de uma bomba de alta pressão. Esta bomba é utilizada para colocar no sistema um fluxo controlado e específico de fase móvel, em mL/min. Posteriormente, um injetor introduz a amostra que se pretende estudar no fluxo de fase móvel, fluxo este que a transporta até à coluna cromatográfica. A coluna apresenta componentes cromatográficos que promovem a separação, sendo que o enchimento desta constitui a fase estacionária. A presença de um detetor é imprescindível, uma vez que permite a observação das bandas de compostos separados, conforme estes eluem na coluna cromatográfica. O sinal enviado pelo detetor é representado num gráfico em



função do tempo, designado por cromatograma, que fornece informações úteis para a análise qualitativa e quantitativa. Por fim, a fase móvel sai do detetor e é enviada para os resíduos [31],[17].

Os principais módulos que constituem o aparelho HPLC são: sistema de bombagem, um injetor, uma coluna cromatográfica, um detetor e um sistema de obtenção de dados.

### **Sistema de bombagem**

O sistema de bombagem fornece a fase móvel com um débito controlado, preciso e exato.

A fase móvel pode ser libertada com uma composição constante durante a análise - eluição isocrática, ou com composição variável - eluição em gradiente, segundo um programa definido.

Devem evitar-se as variações de pressão no sistema. Como tal, os tubos e as ligações devem possuir as características certas de modo a resistirem às pressões desenvolvidas pela bomba. Por sua vez, as bombas também podem ser equipadas com um dispositivo de purga que elimina as bolhas de ar incorporadas.

Um fluxo incorreto de fase móvel pode ser facilmente identificado, uma vez que se pode manifestar pela variação de tempos de retenção (tempo despendido por um componente desde a sua injeção na coluna até à sua deteção) [29].

### **Injetores**

O injetor, concebido para funcionar a pressão elevada, tem a função de introduzir na fase móvel a amostra que se pretende analisar.

Os injetores podem ser em ansa ("*loop*") ou de volume variável, de funcionamento manual ou ainda comandados por um injetor automático (*autosamplers*). Estes últimos devem ser submetidos a programas de lavagem de modo a evitarem a transferência da substância em análise [29].

### **Coluna cromatográfica**

A coluna cromatográfica é onde ocorre o processo de separação dos componentes que compõem a amostra, sendo como tal um dos constituintes mais críticos e fundamentais do processo.

A escolha da coluna a utilizar depende de diversos fatores, como as características da amostra, o mecanismo de separação adotado, fatores químicos relacionados com o enchimento e fatores mecânicos relativos ao revestimento (comprimento, diâmetro interno, material, etc).

O tipo de amostra a analisar condiciona a escolha do enchimento da coluna. Se a amostra for apolar o enchimento da coluna deve ser polar – coluna de fase normal (o revestimento das partículas possui grupos funcionais polares). Por outro lado, se a amostra for polar o enchimento da coluna deve ser apolar – coluna de fase reversa (o revestimento das partículas possui grupos funcionais apolares). As colunas de fase reversa são mais difíceis de danificar, sendo as mais utilizadas.

Quando a fase móvel é apolar requer a utilização de uma coluna de fase normal, por sua vez se a fase móvel for polar então utiliza-se uma coluna de fase reversa.

Na separação de fase normal, o aumento da polaridade faz com que o poder de eluição aumente. Em contrapartida, na separação de fase reversa, o aumento da polaridade provoca a diminuição do poder de eluição.

Relativamente ao mecanismo de separação adotado, existem diferentes materiais que podem constituir o enchimento de uma coluna [29]:

- Sílica, alumina ou grafite porosa – utilizadas em cromatografia de polaridade de fase normal em que a separação assenta numa adsorção diferencial e/ou numa distribuição mássica (cromatografia de partição);
- Resinas ou polímeros com grupos ácidos ou básicos – utilizados em cromatografia de troca iónica, onde a separação assenta na competição entre iões a separar e iões da fase móvel;
- Sílica ou polímeros porosos – utilizados em cromatografia de exclusão em que a separação assenta nas diferenças de volume entre moléculas, o que corresponde a uma exclusão esférica;
- Diversos suportes químicos modificados – preparados a partir de polímeros de sílica ou de grafite porosa, utilizados em cromatografia líquida de fase normal (cromatografia de adsorção) e de fase reversa, em que a separação assenta principalmente na partilha das moléculas entre a fase móvel e a fase estacionária;
- Fases estacionárias quimicamente modificadas especiais – como derivados de celulose ou da amilose, das proteínas ou dos péptidos, para a separação dos enantiómeros (cromatografia quiral).

A maioria das separações utiliza sílica quimicamente modificada como fase estacionária e solventes polares como fase móvel.

A fase estacionária quimicamente ligada (composta por sílica modificada) é obtida através da ligação covalente entre os grupos silanol da sílica (Si-OH) e um grupo funcional (polar ou apolar) que lhe confere uma grande estabilidade química. Os derivados silados obtidos vão ocupar um número variável dos locais reativos da área de suporte. Na tabela 2.2 estão especificadas as fases ligantes mais utilizadas.

Tabela 2.2 - Fases ligantes correntemente mais utilizadas (Adaptado de [29])

Fase ligante	Fórmula química	Designação	Polaridade
<b>Octil</b>	Si-[CH <sub>2</sub> ] <sub>7</sub> -CH <sub>3</sub>	C <sub>8</sub>	Moderadamente apolar
<b>Octadecil</b>	Si-[CH <sub>2</sub> ] <sub>17</sub> -CH <sub>3</sub>	C <sub>18</sub>	Altamente apolar
<b>Fenil</b>	Si-[CH <sub>2</sub> ] <sub>n</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	Moderadamente apolar
<b>Cianopropil</b>	Si-[CH <sub>2</sub> ] <sub>3</sub> -CN	CN	Moderadamente apolar/polar
<b>Aminopropil</b>	Si-[CH <sub>2</sub> ] <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	Polar
<b>Diol</b>	Si-[CH <sub>2</sub> ] <sub>3</sub> -O-CH(OH)-CH <sub>2</sub> -OH		Polar

No geral, as colunas de fase reversa com base em sílica são estáveis para a utilização de fases móveis com pH compreendido entre 2 e 8.

O tamanho das partículas que constituem as fases estacionárias situa-se entre os 2 e 10  $\mu\text{m}$ . Estas podem apresentar forma esférica ou irregular e porosidade variável.

O diâmetro interno da coluna é um parâmetro crítico dado que está relacionado com a quantidade de composto injetado. Colunas com um diâmetro interno menor são preferíveis uma vez que implicam um menor consumo de solventes.

As colunas de HPLC mais comuns são de aço inoxidável com um diâmetro interno de 4,6 mm, constituídas por fase estacionária ligada a partículas esféricas de sílica de pequenas dimensões (5  $\mu\text{m}$  é o mais usual). Uma menor dimensão das partículas implica uma maior superfície de contacto, logo uma melhor capacidade de separação [29].

### **Detetor**

O detetor cromatográfico é um dispositivo conectado ao sistema que emite sinais elétricos, registados sob a forma de picos, quando em contacto com os analitos presentes no eluente.

Existe uma vasta gama de detetores para HPLC. A deteção pode ser feita por detetor de UV-visível, detetor de fluorescência, detetor de índice de refração, detetor eletroquímico, detetor condutimétrico, detetor de espectroscopia de massa, entre outros. A escolha do detetor utilizado dependerá, principalmente, das características químicas ou estruturais dos analitos a detetar.

O detetor de UV-visível é o mais utilizado uma vez que é aquele que apresenta o menor custo, é praticamente insensível a pequenas variações de fluxo e temperatura e é compatível com a utilização de gradientes de solventes [32].

### **Sistema de obtenção de dados**

Os detetores de HPLC emitem um sinal de saída potenciométrico, em mV. Para que esse sinal possa ser quantificado é necessário obter um registo gráfico do mesmo ou então a existência de um aparelho que possua a capacidade de tratar esse sinal, de forma automática [32].

## **2.5.2 Carbono Orgânico Total (TOC)**

Nas indústrias farmacêuticas, a qualidade da água purificada utilizada é fundamental para as atividades que envolvem o seu uso. A análise da concentração de Carbono Orgânico Total (do inglês *Total Organic Carbon*, TOC) é um método bastante aplicado nos dias de hoje para a determinação dessa qualidade.

O Carbono Orgânico Total é encontrado na água em pequenas quantidades, desta forma a sua quantificação só pode ser feita em partes por milhão (ppm) e em partes por bilhão (ppb), sendo o seu principal objetivo avaliar a contaminação da água através da presença de impurezas orgânicas.

No ramo da indústria, as utilizações da metodologia de carbono orgânico total são limitadas, incidindo particularmente na monitorização dos sistemas de produção de água para fins farmacêuticos, Na indústria farmacêutica a aplicabilidade do método destina-se a validações de limpeza de equipamentos (usado para testar resíduos de produtos fabricados anteriormente, detergentes químicos, solventes de produtos e contaminantes microbiológicos), qualificações e à manutenção e controlo de sistemas de águas (purificadas e para injetáveis).

O analisador TOC baseia-se no princípio de oxidação completa a dióxido de carbono das moléculas orgânicas contidas na amostra de água, seguida da análise quantitativa do dióxido de carbono produzido e, a partir do valor obtido, determinação, por cálculo, do teor em carbono da água [33].

O cálculo do TOC pode ser efetuado de duas formas:

- Através da purga inicial do Carbono Inorgânico (IC) existente na amostra, onde algumas substâncias orgânicas podem ser purgadas também. Estas últimas vão ser oxidadas, originando o CO<sub>2</sub>, sendo classificadas de Carbono Orgânico Purgado (POC) [34]:

$$TOC = POC + NPOC$$

Equação 2.7 – Cálculo do valor do carbono orgânico total

NPOC corresponde ao Carbono Orgânico Não Purgado

- Determinação do Carbono Orgânico Total pela diferença dos valores obtidos de Carbono Inorgânico e Carbono Total (TC) [34]:

$$TOC = TC - IC$$

Equação 2.8 – Cálculo do valor do carbono orgânico total

A oxidação completa dos compostos orgânicos a dióxido de carbono pode efetuar-se por diferentes processos:

Tabela 2.3 - Processos pelos quais pode ocorrer a oxidação de compostos orgânicos a CO<sub>2</sub>, por TOC [33]

<b>Processo de oxidação dos compostos orgânicos</b>
Combustão
Persulfato aquecido
Radiação UV
Radiação UV / Persulfato
Radiação UV / Dióxido de titânio

Os diferentes métodos que permitem a quantificação do CO<sub>2</sub> são os seguintes:

Tabela 2.4 - Processos pelos quais pode ser efetuada a análise quantitativa do Dióxido de Carbono [33]

Processos de detecção e quantificação de CO <sub>2</sub>
Infravermelho não disperso (NDIR)
Condutividade direta
Membrana de condutividade

### Funcionamento do analisador TOC Sievers DataPro 900

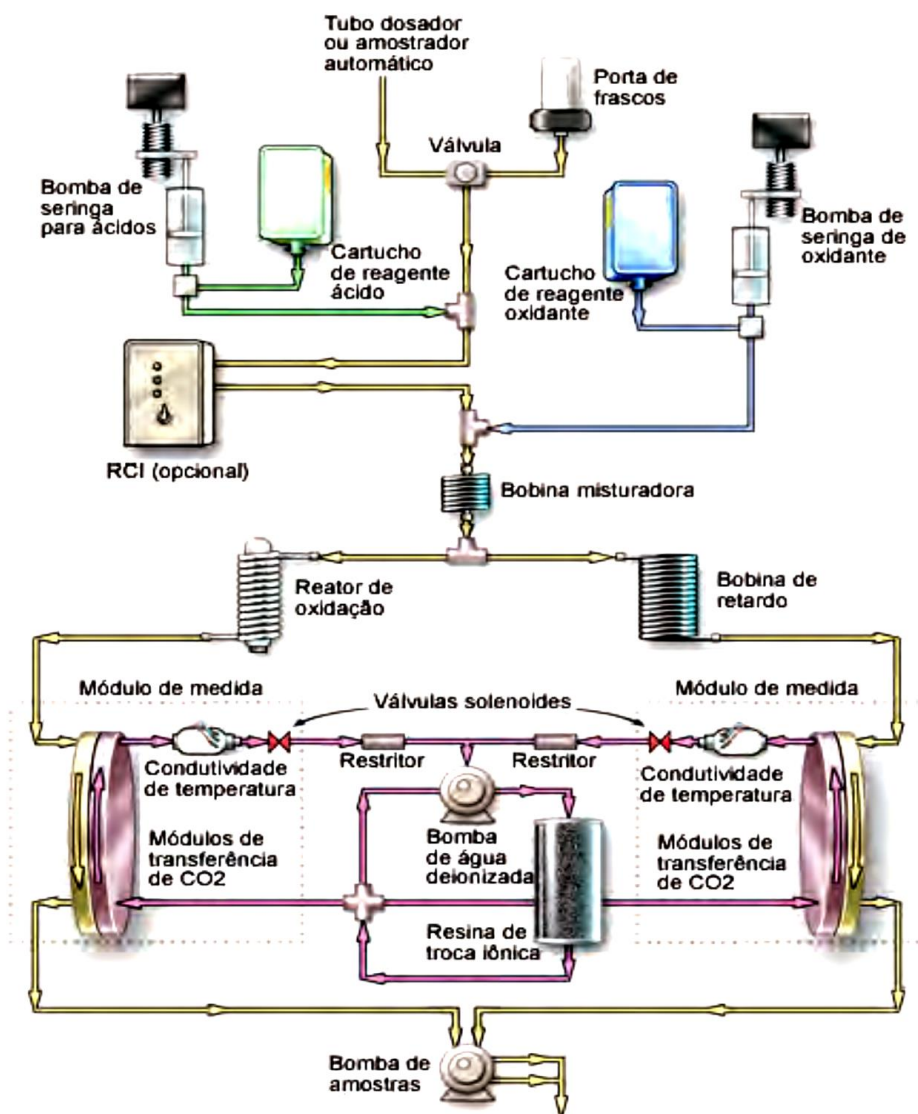
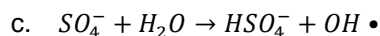
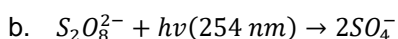
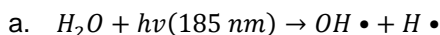


Figura 2.5 - Representação esquemática do aparelho TOC [35]

Tendo em conta a figura 2.5, inicialmente, a amostra a analisar é introduzida num vial de 40 mL e este é colocado no amostrador automático GE. A amostra é injetada no sistema através de uma seringa que procede à recolha de um certo volume de solução. De seguida, a amostra é acidificada com ácido fosfórico 6M, de modo a reduzir o pH da amostra para um valor entre 2 e 3, permitindo a medição precisa de TOC e IC.

O sistema apresenta uma unidade removedora de carbono inorgânico opcional, e, se esta for usada, o IC em excesso é removido por desgaseificação a vácuo. A amostra que foi acidificada é então combinada com um agente químico oxidante, persulfato de amónio a 15%, de modo a promover a oxidação de compostos orgânicos. A amostra vai passar por uma bobina misturadora e seguir para um divisor de fluxo. O divisor de fluxo divide o fluxo de amostra em dois fluxos iguais, sendo um fluxo processado para a medição do IC e o outro processado para a medição do TC [36].

O fluxo de TC passa por um reator de oxidação onde a amostra é exposta à luz UV. A combinação da luz UV e do persulfato oxida os compostos orgânicos presentes na amostra, convertendo o carbono em CO<sub>2</sub>. O reator é um tubo espiral de quartzo situado em volta da lâmpada UV, que emite luz a 185 e 254 nm. Formam-se assim agentes de oxidação químicos potentes sob a forma de radicais hidroxilo, produzidos pela fotólise da água (eq. a) e persulfato (eq. b e c):



Os radicais hidroxilo (OH•) irão oxidar completamente os compostos orgânicos, convertendo os átomos de carbono do composto orgânico em CO<sub>2</sub>:



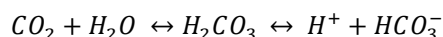
No caso da concentração de TOC na amostra ser baixa (<1 ppm), a oxidação completa pode ser obtida usando apenas os radicais hidroxilo da fotólise da água (eq. a), sem a adição de persulfato.

O fluxo de IC passa pela bobina de retardo, designada para tornar iguais o tempo total de andamento do fluxo de IC e de TC através do analisador.

Quando o fluxo de IC sai da bomba de retardo e o fluxo de TC do reator de oxidação, dirigem-se ambos para os respetivos módulos de transferência de CO<sub>2</sub>. Nesta secção, a transferência de CO<sub>2</sub> é realizada por uma membrana permeável a gases. A membrana separa o lado da amostra do analisador do lado do sistema de água desionizada (DI). O lado de DI do analisador constitui um circuito fechado e apresenta duas células de condutividade (uma para o fluxo de TC e outra para o fluxo de IC), uma bomba de água desionizada, um reservatório de água desionizada e a resina de troca iónica (cama de resina).

A permeabilidade da membrana ao CO<sub>2</sub> permite que este a atravesse, difundindo-se, através dela, para um compartimento que contém água desionizada. Enquanto isso, alguns compostos

interferentes e outros subprodutos da oxidação são bloqueados pela membrana e permanecem no lado da amostra. O CO<sub>2</sub> reage com a água e forma ácido carbônico. Este dissocia-se em íons hidrogênio (H<sup>+</sup>) e íons bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>):



A água desionizada é continuamente bombeada através do lado de DI do analisador, efetuando a recolha dos íons H<sup>+</sup> e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. As moléculas de H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e CO<sub>2</sub>, provenientes dos módulos de transferência de CO<sub>2</sub>, são levadas para as células de condutividade para análise. A resina de troca iónica tem a função de remover o HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e outros íons. Por sua vez, a água é bombeada de volta ao módulo de transferência de CO<sub>2</sub> e repete a sequência.

O CO<sub>2</sub> presente nos fluxos de amostra de TC e IC é medido pelas respectivas células de condutividade, e essas leituras são usadas para calcular a concentração de TC e IC. Depois de os valores serem medidos, o TOC será calculado pela sua diferença:

$$TOC = TC - IC$$

Equação 2.9 – Cálculo do valor de TOC

A leitura de TC, IC e TOC é expressa em unidades de concentração de carbono (ppb de C ou ppm de C) [36].

### 2.5.3 Condutimetria

A condutimetria é um método de análise de íons que se baseia na medida de condutividade elétrica de uma solução. Por sua vez a condutividade elétrica é a capacidade que uma solução aquosa apresenta para conduzir a corrente elétrica. Esta depende da concentração e natureza das várias espécies químicas presentes na solução, que definem a capacidade de transporte de carga [37].

A corrente I (em amperes) que passa num condutor é diretamente proporcional à força eletromotriz aplicada E (em volts) e inversamente proporcional à resistência R (em ohm) do condutor:

$$I = \frac{E}{R}$$

Equação 2.10 – Cálculo da corrente

A condutividade de uma solução (k) corresponde ao inverso da resistividade (ρ). Esta é definida como sendo o quociente do campo elétrico pela densidade da corrente. A resistência R (em ohm) de um condutor de secção S (em cm<sup>2</sup>) e de comprimento L (em cm), é dada pela expressão:

$$R = \rho \cdot \frac{L}{S}$$

Equação 2.11 – Cálculo da resistência

Onde:

$$\rho = \frac{1}{k}$$

Equação 2.12 – Cálculo da resistividade

Logo:

$$R = \frac{1}{k} \cdot \frac{L}{S} \text{ ou } k = \frac{1}{R} \cdot \frac{L}{S}$$

Equação 2.13 – Cálculo da condutividade

$\frac{L}{S}$  corresponde à constante da célula ideal. A sua determinação pelo cálculo da distância entre os elétrodos e da sua área não é possível pelo facto do campo eléctrico entre eles não ser homogéneo. Como tal deve ser determinada através da medição de uma solução de resistividade conhecida e esta deve ser da mesma ordem de grandeza da solução a determinar. A solução de referência utilizada, em geral, é uma solução padrão de cloreto de potássio.

No sistema internacional, a unidade da condutividade é o siemens por metro (S/m). Mas na prática, a condutividade eléctrica de uma solução é expressa em siemens por centímetro (S/cm) ou em microsiemens por centímetro ( $\mu\text{S/cm}$ ). A resistividade, segundo o sistema internacional, tem como unidades o ohm.metro ( $\Omega\cdot\text{m}$ ), sendo mais usual expressar a resistividade de uma solução em ohms.centímetro ( $\Omega\cdot\text{cm}$ ).

Por norma, utiliza-se uma temperatura de referência de 25 °C para exprimir a condutividade ou a resistividade [38].

O condutímetro *Cyberscan 300* permite determinar o valor da resistência da coluna de líquido compreendida entre os elétrodos do elemento de medida imerso (célula de medida). O aparelho é alimentado por tensão alterna de modo a evitar os efeitos da polarização dos elétrodos. É constituído por uma sonda de temperatura e um dispositivo de compensação de temperatura. A célula de medida é constituída por dois elétrodos de platina paralelos, recobertos de negro de platina, apresentando, cada um, uma superfície S, mantidos a uma distância L entre si e, geralmente, protegidos por um invólucro de vidro [38].

## 2.6 Tratamento de resultados - Testes estatísticos

A estatística é uma ferramenta fundamental na análise qualitativa e quantitativa de um determinado analito, é através dela que se consegue assegurar a qualidade, comprovar a eficiência e demonstrar a exatidão dos resultados das medições nas análises químicas. Algumas das estatísticas aplicadas na validação são enumeradas de seguida [23]:

- **Média Aritmética ( $\bar{x}$ ):** É dada pela soma de todos os dados divididos pelo número total de dados.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Equação 2.14 – Cálculo da média aritmética



Sendo:

$x_i$  – valor do elemento  $i$

$n$  – número total dos elementos

A média da população simboliza-se por  $\mu$ .

- **Variância ( $s^2$ ):** É a média da soma dos quadrados das diferenças entre cada dado e a média aritmética da amostra.

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

Equação 2.15 – Cálculo da variância

Sendo:

$x_i$  – valor do elemento  $i$

$n$  – número total dos elementos

$\bar{x}$  – média aritmética

A variância da população simboliza-se por  $\sigma^2$ .

- **Graus de liberdade ( $\vartheta$ ):** É a diferença entre o tamanho da amostra ( $n$ ) e o número ( $a$ ) de parâmetros estimados a partir da amostra.

$$\vartheta = n - a$$

Equação 2.16 – Cálculo dos graus de liberdade

- **Desvio padrão ( $s$ ):** É a raiz quadrada da variância.

$$s = \sqrt{s^2}$$

Equação 2.17 – Cálculo do desvio padrão

Sendo  $s^2$  a variância.

- **Coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (RSD):** É o quociente entre o desvio padrão e a média.

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Equação 2.18 – Cálculo do desvio padrão relativo

Sendo:

$s$  – desvio padrão

$\bar{x}$  – média aritmética

- **Linearidade:** Para estudar a linearidade é necessária uma representação gráfica dos valores obtidos pelo método ( $y$ ), que podem ser por exemplo absorvência ou áreas dos picos, em função da concentração de analito ( $x$ ). Obtém-se uma representação do tipo  $y=mx+b$  que é ajustada

pelo método dos mínimos quadrados. Dela podem-se retirar os parâmetros declive da reta (m), ordenada na origem (b), coeficiente de correlação (r) e o coeficiente de determinação (r<sup>2</sup>). No seguimento do estudo procede-se a uma análise de variância – ANOVA.

- **Análise de variância – ANOVA:** Técnica estatística que permite comparar métodos através da relação de uma variável independente categórica com uma variável dependente quantitativa.

Tabela 2.5 - Análise de variância - ANOVA

	Soma de Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade	Variância
<b>Regressão</b>	$SQ_{REG} = \sum_{n=1}^n (\bar{y}_n - \bar{y})^2$	1	$V_{REG} = \frac{SQ_{REG}}{gl_{REG}}$
<b>Residual</b>	$SQ_{RES} = \sum_{n=1}^n (y_n - \hat{y}_n)^2$	$\sum_i n_i - 2$	$V_{RES} = \frac{SQ_{RES}}{gl_{RES}}$
<b>Falta de ajuste</b>	$SQ_{FA} = \sum_{i=1}^{n_i} (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2 \times n_i$	$n_i - 2$	$V_{FA} = \frac{SQ_{FA}}{gl_{FA}}$
<b>Erro Experimental</b>	$SQ_{EXP} = \sum_i \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$\sum_i n - n_i$	$V_{EXP} = \frac{SQ_{EXP}}{gl_{EXP}}$
<b>Total</b>	$SQ_T = SQ_{RES} + SQ_{REG}$	$\sum_i n_i - 1$	

Sendo:  $\bar{y}$  – o valor médio de todas as áreas dos picos.

$\bar{y}_i$  – o valor médio das áreas dos picos de um grupo i de concentrações

$\hat{y}_i$  – o valor estimado de áreas dos picos do grupo i de concentrações ( $\hat{y}_i = mx_i + b$ )

$y_{ij}$  – valores de áreas dos picos de todos os grupos

n – n<sup>o</sup> total de ensaios

$n_i - j$  – n<sup>o</sup> de ensaios no grupo i de concentrações

i – grupos com a mesma concentração

j – séries

## Teste de Fisher-Snedecor

$$F_1 = \frac{V_{REG}}{V_{RES}} \quad F_0 (\alpha=0,05, V_{REG}, V_{RES}) \text{ tabelado}$$

$$F_2 = \frac{V_{FA}}{V_{EXP}} \quad F_0 (\alpha=0,05, V_{FA}, V_{EXP}) \text{ tabelado}$$

$F_1 > F_0$  – declive diferente de zero

$F_2 < F_0$  – a dispersão obtida deve-se somente a erros de ordem experimental

- **Teste de proporcionalidade**

$$t_{exp} = \frac{|a|}{s_a} \quad s_a \text{ obtém-se a partir do cálculo de variância residual } s^2_{y,x}$$

Os intervalos de confiança obtêm-se a partir da expressão:  $a \pm t \times s_a$ , sendo  $t$  o valor da distribuição de Student para  $n-2$  graus de liberdade e um grau de significância  $\alpha=0,05$ .

O intervalo de confiança não deve incluir o zero.

- **Variância residual ( $s^2_{y,x}$ ):**

$$s^2_{y,x} = \frac{\sum (y_i - \hat{y})^2}{n - 2}$$

Equação 2.19 – Cálculo da variância residual

- **Repetibilidade:** Avalia a precisão do método (precisão entre ensaios)

$$R = t \times CV \times \sqrt{2}$$

Equação 2.20 – Cálculo da repetibilidade

Sendo:

$t$  – valor estatístico de t-student para um nível de confiança de  $1-\alpha$  e 5 graus de liberdade

$CV$  – Coeficiente de variação

- **Recuperação (R%):** Calcula a percentagem de recuperação de uma amostra em relação ao valor médio especificado.

$$R(\%) = \frac{x}{\mu} \times 100$$

Equação 2.21 – Cálculo da percentagem de recuperação

Sendo:

$x$  – valor da concentração encontrada

$\mu$  - valor aceite como verdadeiro

- **Resíduos:** Avalia a diferença entre a medida efetuada e o valor médio especificado.

$$\text{Resíduos} = X - \bar{X}$$

Equação 2.22 – Fórmula de cálculo dos resíduos

- Teste de Cochran: Permite testar a homogeneidade das variâncias (Linearidade) e determinar se o fator de concentração influi nos resultados (Exatidão).

$$G_{exp} = \frac{s_{máx}^2}{\sum_i s_i^2}$$

Equação 2.23 – Cálculo do valor de  $G_{exp}$  (Teste de Cochran)

Sendo:

$s^2$  – Variância de cada grupo K

$s_{máx}^2$  – Variância máxima dos k grupos

$G_{exp} < G_0$  – determina-se a partir das correspondentes tabelas

- **t de student (t):** Permite calcular a repetibilidade (Precisão entre ensaios).
- **Teste de student (t):** Permite avaliar se a recuperação é satisfatória (Exatidão).

$$t_{exp} = |100 - x| \times \frac{\sqrt{n}}{CV}$$

Equação 2.24 – Cálculo do  $t_{exp}$  (Teste de Student)

Sendo:

x – média obtida

n – nº de amostras

CV – coeficiente de variação

- **Adequabilidade do sistema (HPLC)**

**Fator de capacidade (k):**

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Equação 2.25 – Cálculo do fator de capacidade

Sendo:

$t_0$  – tempo de retenção da fase móvel

$t_R$  – tempo de retenção da substância ativa

**Nº de pratos teóricos (N):**

$$N = 16 \times \left( \frac{t_R}{W} \right)^2$$

Equação 2.26 - Cálculo do número de pratos teóricos

Sendo:

$t_R$  – tempo de retenção da substância ativa

W – largura do pico na linha de base, determinado pela tangente ajustada a 1% da altura do pico

**Fator de simetria (T):**

$$T = 16 \times \frac{W_{0.05}}{2F}$$

Equação 2.27 – Cálculo do fator de simetria

Sendo:

$W_{0.05}$  – largura do pico a 5% da altura do pico

F – distância entre a perpendicular traçada desde o máximo do pico e 5% da altura do pico

**Resolução ( $R_s$ ):**

$$R_s = C \times \frac{t_{R1} - t_{R2}}{W_1 - W_2}$$

Equação 2.28 – Cálculo da resolução

Sendo:

$t_{R1}$  e  $t_{R2}$  – ( $t_{R1} > t_{R2}$ ) tempo de retenção (tempo de eluição do máximo do pico medido desde o início da injeção)

C – Constante cujo valor varia segundo o critério com que se mede a largura do pico

$W_1$  e  $W_2$  – largura do pico a meia altura ( $C = 1,18$  (EP)).

## 2.7 Descrição das substâncias utilizadas na qualificação

### Sulfametoxazol

O sulfametoxazol é um antibiótico do grupo das sulfonamidas com atividade bacteriostática (detém o crescimento de determinadas bactérias, dificultando a sua proliferação). Este é frequentemente combinado com trimetopim, também um antibiótico. A FAES FARMA comercializa um medicamento, BRONQUIDIAZINA CR, que apresenta na sua constituição estas duas substâncias ativas. Este é indicado para o tratamento de infeções no aparelho respiratório e para a prevenção ou tratamento da pneumonia [39].

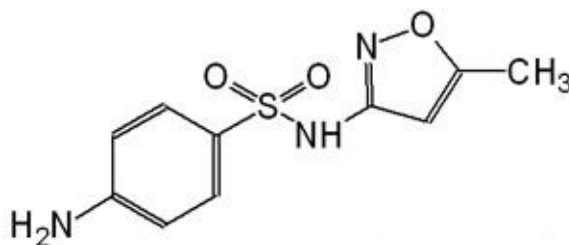


Figura 2.6 - Estrutura química do sulfametoxazol [40]

## Cloreto de Sódio

O cloreto de sódio é um dos mais importantes e conhecidos sais da química inorgânica. Na sua constituição, por cada átomo de cloro existe um átomo de sódio, sendo a sua fórmula química NaCl. Dotado de uma elevada hidrossolubilidade e solubilidade na maioria dos solventes polares, é comumente designado por sal de cozinha e apresenta o aspeto de pequenos sólidos cristalinos de cor branca [41].

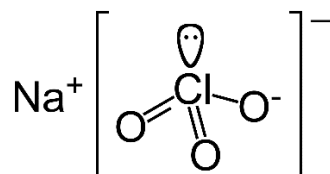


Figura 2.7 - Estrutura química do Cloreto de Sódio [42]

A sua elevada solubilidade faz com que esta substância seja importante para o trabalho em questão, uma vez que a sua pesquisa no material lavado permite tirar conclusões sobre a eficácia do processo de lavagem.

## Neutralizante *Neodisher Z*

O neodisher z é um detergente e agente de neutralização ácido. Este é responsável por efetuar a neutralização de resíduos alcalinos e/ou uma acidificação pré-lavagem, sendo aplicado sob diversos instrumentos médicos (como utensílios cirúrgicos e de anestesia) e material de vidro utilizado em laboratórios industriais.

É constituído essencialmente por ácido cítrico anidro, com uma concentração entre 25 e 50%. A ausência de fosfatos e surfactantes na sua constituição faz do neodisher z um forte agente de neutralização de material de vidro laboratorial para análises rigorosas de águas [43],[44].

## Detergente *Neodisher FLA*

O detergente Neodisher FLA é um detergente universal, alcalino e com uma elevada quantidade de dispersantes. Segundo o fabricante, apresenta na sua composição 5-10% de ácido nitrilotriacético e sal trissódico e 20-40% de hidróxido de potássio, não contendo fosfatos, surfactantes ou agentes de oxidação.

O detergente é apropriado para lavagens automáticas de material de laboratório (de vidro, aço inoxidável, plástico ou cerâmica) nas áreas da medicina, biologia, microbiologia e química [45].

### **Detergente *Labwash***

Existem diferentes tipos de detergente Labwash, sendo o Labwash Premium Powder PF o utilizado no Controlo de Qualidade dos Laboratórios Vitória.

O Labwash Premium Powder PF é um detergente alcalino em pó, designado para máquinas de lavar laboratoriais. É composto por alcali caustico (>30%), aditivos dispersantes e silicatos, não apresentando na sua constituição surfactantes, fosfatos nem cloro ativo. O detergente remove efetivamente até os resíduos mais persistentes, devido à combinação da elevada alcalinidade e da eficiência dos aditivos dispersantes [46].





### 3. Metodologia, materiais e métodos

#### 3.1 Qualificação da *performance* das máquinas de lavagem de material

A principal finalidade da qualificação da *performance* das máquinas de lavar material de laboratório é comprovar que estas cumprem a função a que se destinam, em condições normais de funcionamento, eliminando assim quaisquer indícios de contaminações residuais.

A existência de contaminação residual no material de laboratório (material utilizado em análises físico-químicas e microbiológicas) poderá originar, nos ensaios posteriores, resultados errados ou desviados dos habituais. Por essa razão, pretende-se garantir que os processos de lavagem utilizados pelas máquinas apresentam a capacidade de retirar todas as partículas e substâncias contaminantes depositadas no interior do material em questão.

##### 3.1.1 Planeamento da qualificação

A qualificação da *performance* vai consistir na contaminação de diverso material de laboratório por diferentes substâncias químicas. Estas substâncias são o Cloreto de sódio (substância solúvel em água), o Sulfametoxazol (substância insolúvel em água), os detergentes Neodisher FLA e Labwash e o neutralizante Neodisher Z, sendo estes três últimos utilizados pelas máquinas nos respetivos programas de lavagem.

Inicialmente o material é contaminado e, após a secagem com o ar, este é submetido ao processo normal de lavagem. Depois de sair da máquina, o material é deixado na bancada a secar, de forma a eliminar os vestígios de água que não foram eliminados no processo de secagem do equipamento. Posteriormente, o material é enxaguado repetidamente, recolhendo-se e reunindo-se as águas daí resultantes para análise subsequente.

A análise que se efetua posteriormente depende da substância contaminante, uma vez que para cada uma das substâncias existe um método analítico que se adequa melhor à sua deteção. Neste caso, para detetar a presença do sulfametoxazol no material utiliza-se um método analítico específico, sensível e rigoroso, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Por sua vez, quando se pretende rastrear a presença ou de cloreto de sódio ou de neodisher FLA o método utilizado é a condutimetria. Este método é comum na deteção de produtos inorgânicos dissolvidos em água, sendo sensível e rápido. Por fim, para detetar a existência de neodisher Z e labwash utiliza-se um método analítico não específico, o carbono orgânico total (TOC).

A aplicação desta metodologia pretende verificar a eficácia da sequência da lavagem e secagem na remoção de contaminantes.

A tabela 3.1 apresenta o planeamento da qualificação de forma resumida.

Tabela 3.1 - Planeamento da qualificação

Material	Produto a detetar	Método analítico	Critérios de aceitação
<b>Balões volumétricos:</b> 10 ml e 1000 ml  <b>Pipetas graduadas:</b> 5 ml e 10 ml  <b>Pipetas diferenciais:</b> 20 ml e 50 ml  <b>Provetas:</b> 50 ml  <b>Tubos de ensaio:</b> 30 ml  <b>Copos polipropileno:</b> 50 ml e 250 ml  <b>Copos de filtração:</b> 300 ml  <b>Frascos e tampas:</b> 100 ml, 1000 ml e 2000 ml  <b>Almofariz e pilão</b>  <b>Espátulas</b>  <b>Pinças</b>	Sulfametoxazol	HPLC	$\leq 1 \mu\text{g/ml}$
	Neodisher FLA Cloreto de sódio	Condutimetria	$< 3 \mu\text{S/cm}$
	Neodisher Z Labwash	TOC	$\leq 500 \text{ ppb } (\leq 0,5 \text{ mg/l})$
<b>Água Purificada</b>	Sais	Condutimetria	$< 3 \mu\text{S/cm}$
	Compostos orgânicos	TOC	$\leq 500 \text{ ppb } (\leq 0,5 \text{ mg/l})$

### 3.1.2 Materiais e equipamentos

#### Equipamentos

- Condutivímetro
- Cyberscan pH 2000
- Sistema de HPLC (Waters 7)
- Analisador TOC Sievers DataPro 900
- Balança Metler MX5
- Balança Mettler XS 205 Dual

### **Materiais**

- Frascos (*vials*) e septos para HPLC
- Frascos (*vials*) e tampas para TOC
- Micropipeta 10-100 µl
- Material volumétrico - Classe A
- Material diverso de laboratório

### **Reagentes**

- Água purificada
- Cloreto de Sódio
- Sulfametoxazol
- Detergente Labwash
- Neutralizante Neodisher Z
- Detergente Neodisher FLA

Para se proceder à qualificação foi selecionado algum material de laboratório. Esta seleção foi cuidadosamente definida de forma a abranger todo o tipo de material utilizado nos ensaios diários do Controlo da Qualidade (material utilizado em ensaios físico-químicos e microbiológicos).

Com isto pretende-se demonstrar que, mesmo aquele de menor dimensão ou calibre, após um ciclo normal de lavagem, se apresenta num estado de limpeza adequado para posterior utilização – validação de limpeza do material de laboratório.

O material selecionado é o seguinte:

- **Balões volumétricos aferidos:** constituem o grupo de material mais utilizado num laboratório sendo aqueles que contactam com o produto no estado final da análise.
- **Pipetas aferidas:** são ensaiados os tamanhos (volume mínimo e máximo) utilizados no laboratório.
- **Provetas, copos de polipropileno e tubos de ensaio:** utilizadas no laboratório para conter, medir ou transferir soluções diversas.
- **Copos de filtração:** utilizados no laboratório de microbiologia para efetuar a filtração em diversas análises.
- **Frascos e tampas de frascos:** utilizados no laboratório de microbiologia para recolha de pontos de águas para posterior análise, armazenar meios de cultura (TSB), entre outros.
- **Espátulas, pinças, almofariz e pilão:** utilizadas no laboratório de microbiologia para diversas análises.

### 3.1.3 Análise de risco e identificação do pior caso

Para se proceder à qualificação da performance das máquinas de lavar material e, simultaneamente, à validação de limpeza do material de laboratório, este foi contaminado com diferentes substâncias, sendo uma delas muito insolúvel em água. Para determinar qual a substância insolúvel a utilizar na contaminação do material foi efetuada uma análise de risco e identificou-se o pior caso.

Tal como foi referido no capítulo 2, na identificação do pior caso foram estudados três parâmetros. Cada um apresenta uma pontuação de 1 a 3 consoante o valor de toxicidade, solubilidade ou concentração, e o produto considerado o pior caso é aquele que apresentar a maior pontuação. As tabelas 3.2, 3.3 e 3.4 mostram os diferentes parâmetros analisados e as respetivas categorias e pontuações.

A toxicidade é medida em dose letal ( $DL_{50}$ ) que corresponde à dose necessária de uma dada substância capaz de matar 50% dos indivíduos de uma população em teste.

Tabela 3.2 - Categorização do parâmetro toxicidade do produto

<b><math>DL_{50}</math> (mg/Kg)</b>	<b>Categoria</b>	<b>Pontuação</b>
$\geq 5000$	Baixa	1
4999-601	Média	2
$\leq 600$	Alta	3

Tabela 3.3 - Categorização do parâmetro solubilidade da substância ativa na água

<b>Solubilidade (g/l)</b>	<b>Categoria</b>	<b>Pontuação</b>
$> 10$	Solúvel	1
1-10	Pouco solúvel	2
$< 1$	Insolúvel / Muito pouco solúvel	3

Tabela 3.4 - Categorização do parâmetro da concentração de substância ativa no produto

<b>Concentração de substância ativa (%)</b>	<b>Categoria</b>	<b>Pontuação</b>
$\leq 30$	Baixo	1
31-70	Média	2
$> 71$	Alto	3

Neste trabalho em específico, como se trata de uma análise de risco para determinação da substância mais insolúvel, foram considerados apenas os fatores toxicidade e solubilidade da

substância ativa em água. Assim, a substância que apresentar uma menor solubilidade e elevada toxicidade é a escolhida como pior caso.

Para a análise de risco foram analisadas 3 substâncias ativas:

- Sulfametoxazol
- Hidrosmína
- Mesalazina

O sulfametoxazol é a substância considerada pela FAES FARMA como o melhor candidato a pior caso visto ser muito insolúvel em água. Por sua vez, as duas últimas substâncias correspondem às substâncias ativas do Venosmil e Claversal, respetivamente. A principal razão que levou à escolha destas duas últimas substâncias ativas deve-se ao facto de serem dos produtos que mais “passam” pelo controlo de qualidade dos Laboratórios Vitória, quer em ensaios de estabilidade, produto acabado ou validações.

Tabela 3.5 - Resumo da análise de risco para as três substâncias ativas estudadas [47],[48],[49],[50],[51],[52]

	<b>Solubilidade (g/l)</b>	<b>Toxicidade (mg/Kg)</b>	<b>Pontuação</b>
<b>Sulfametoxazol</b>	Insolúvel (0,61)	Média (2300)	5
<b>Hidrosmína</b>	Pouco solúvel (8,48)	Baixa (5000)	3
<b>Mesalazina</b>	Insolúvel (0,84)	Baixa (5000)	4

A partir da tabela 3.5 conclui-se que a substância ativa que apresenta as melhores características para ser a escolhida como o pior caso é o sulfametoxazol, uma vez que é a mais insolúvel e a que apresenta uma toxicidade mais elevada, adquirindo uma maior pontuação. O sulfametoxazol será então a substância insolúvel utilizada para a qualificação da performance das máquinas de lavar material de laboratório.

#### **3.1.4 Preparação das substâncias contaminantes**

- **Solução contaminante de Sulfametoxazol**

Os ensaios com sulfametoxazol foram executados com uma solução contaminante a 1% em fase móvel (água acidificada a pH 2,5 e acetonitrilo, na proporção 65:35).

Como tal, adicionou-se 2 g de sulfametoxazol a um balão volumétrico de 200 ml. Dado que o sulfametoxazol é insolúvel em água, se este fosse dissolvido diretamente na fase móvel não se iria dissolver. Assim, adicionou-se ao balão os 70 ml de acetonitrilo e colocou-se no banho de ultrassons durante cerca de 10 minutos, de modo a dissolver a totalidade da substância. Posteriormente

adicionaram-se os 130 ml de água acidificada, agitou-se e homogeneizou-se a solução, deixando-a repousar por uns minutos.

- **Solução contaminante de Cloreto de Sódio**

Os ensaios com o cloreto de sódio executaram-se com uma solução contaminante a 10% (p/v) em água purificada.

Inicialmente pesou-se 20 g de cloreto de sódio para um balão volumétrico de 200 ml. De seguida, adicionou-se a água purificada e colocou-se nos ultrassons durante cerca de 5 minutos. Por fim, completou-se o volume com o mesmo solvente e agitou-se a solução obtida.

- **Solução contaminante de Neodisher Z**

Nos ensaios com o neutralizante Neodisher Z utilizou-se uma solução a 5% (v/v) em água purificada.

A preparação da solução consistiu em pipetar 10 ml de neutralizante para um balão volumétrico de 200 ml, adicionando-se a água purificada até completar o volume. No final, agitou-se a solução obtida.

- **Solução contaminante de Neodisher FLA**

Os ensaios com o detergente *Neodisher FLA* foram efetuados com uma solução a 10% (v/v) em água purificada. Assim, introduziu-se 20 ml de detergente num balão volumétrico de 200 ml. De seguida adicionou-se a água purificada até perfazer o volume e agitou-se a solução.

- **Solução contaminante de Labwash**

Nos ensaios com o detergente *Labwash* utilizou-se uma solução a 5% (p/v) em água purificada. Como tal, pesou-se 10 g de detergente para um balão volumétrico de 200 ml, sendo colocado posteriormente nos ultrassons, já com água purificada, durante cerca de 10 minutos. De seguida completou-se o volume com o mesmo solvente e agitou-se a solução obtida.

### **3.1.5 Determinação dos critérios de aceitação**

Neste trabalho em específico, é necessário estabelecer critérios de aceitação para o cloreto de sódio, neodisher FLA, neodisher Z, labwash e sulfametoxazol, demonstrando-se assim a eficácia de remoção destes no processo de lavagem nas máquinas.

A tabela 3.1 demonstra os critérios de aceitação para cada uma das substâncias.

As águas de enxaguamento resultantes da lavagem do material contaminado com cloreto de sódio e neodisher FLA podem apresentar um valor máximo de condutividade de 3  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Este valor é o limite máximo de condutividade considerado para a água purificada, garantido a ausência de qualquer resíduo [53].

A presença de neodisher Z e labwash nas águas provenientes do enxaguamento de material é detetada pelo método do carbono orgânico total, apresentando um limite máximo de 500 ppb (0,5 mg/l). Este valor corresponde ao valor máximo de TOC aceitável para a água purificada e água para a preparação de injetáveis [54]. Admitindo como valor máximo para as águas de enxaguamento o valor máximo da água purificada garante-se que não existem vestígios das substâncias em causa.

Relativamente ao sulfametoxazol, a sua deteção nas águas de enxaguamento do material submetido à lavagem apresenta o limite máximo de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , valor estabelecido pela FAES FARMA.

### **3.1.6 Funcionamento das máquinas de lavagem de material do Controlo da Qualidade**

A qualificação da *performance* foi realizada em três máquinas de lavar material existentes no Controlo da Qualidade, duas delas presentes no laboratório físico-químico (Miele G7835 CD e Miele PG8583 CD) e a outra no laboratório de microbiologia (Miele G7733).

#### **Miele G 7835 CD**

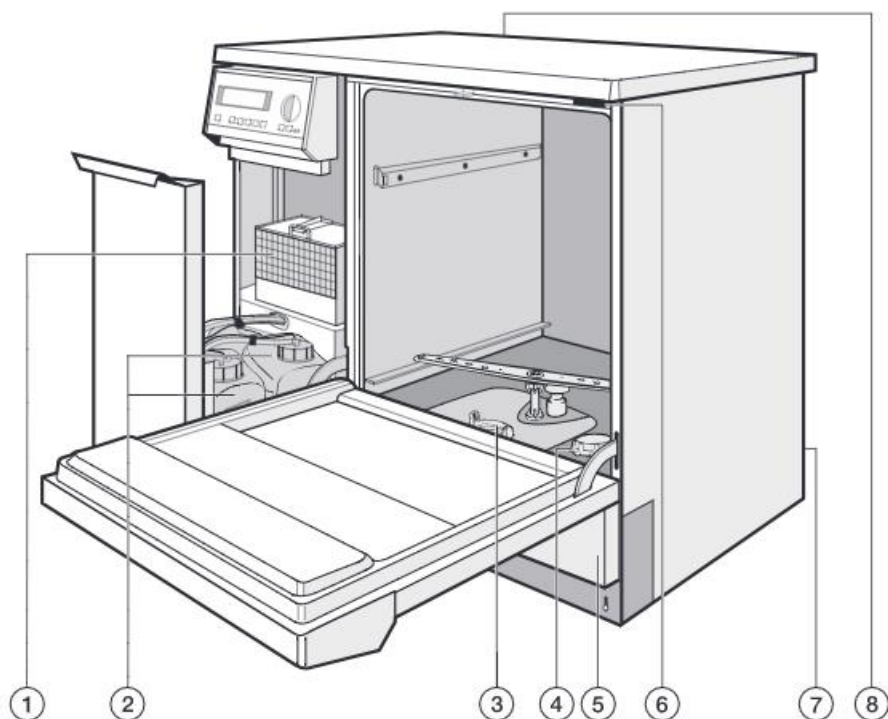
A máquina Miele G 7835 CD trata-se de uma máquina de lavar material de laboratório, sendo utilizada nos Laboratórios Vitória para a lavagem da maioria do material existente (como material de vidro, de plástico ou de metal). Nos seus programas de lavagem utiliza um detergente líquido (Neodisher FLA) e um produto neutralizador (Neodisher Z). A descrição da máquina encontra-se detalhada na figura 3.1.

#### **Miele PG 8583 CD**

A máquina Miele PG 8583 CD é uma máquina de lavagem e desinfecção de vidraria e utensílios de laboratório. Esta utiliza o Neodisher FLA como detergente líquido e o Neodisher Z como agente de neutralização, estando a sua descrição presente na figura 3.2.

#### **Miele G 7733**

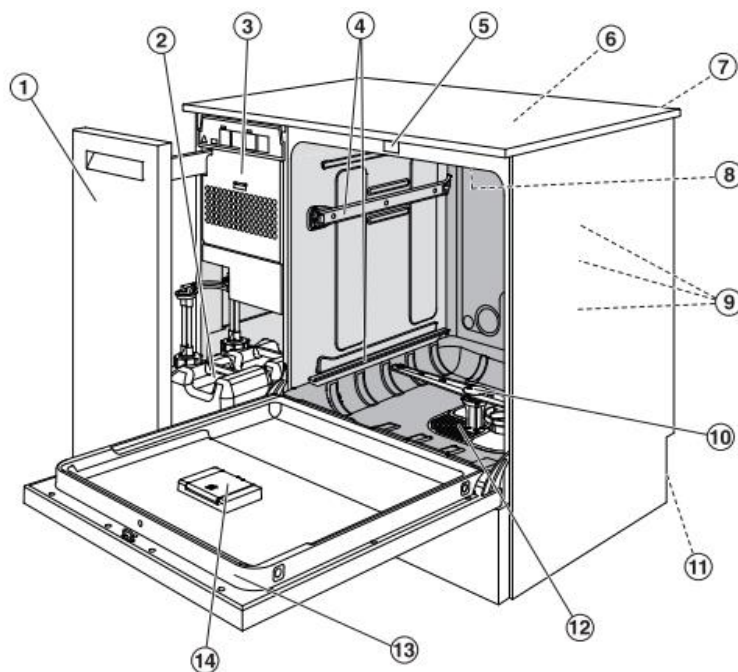
A máquina Miele G7733 encontra-se no laboratório de microbiologia, sendo responsável pela lavagem de todo o tipo de material envolvido nos ensaios microbiológicos, como frascos, copos de filtração, almofarizes e pilões, espátulas, pinças, tubos de ensaios, entre outros. O programa de lavagem desta máquina requer apenas a utilização do detergente em pó Labwash.



- |  |  |
|--|--|
| 1. Unidade de secagem  | 6. Entrada da sonda de medição para validação  |
| 2. Reservatórios para produto neutralizador (vermelho) e detergente líquido (azul) | 7. Ligação para módulo DOS G 60 "Bomba doseadora para produto neutralizador" (branco) e "Bomba doseadora para produto desinfetante químico" (verde) – zona posterior |
| 3. Combinação de filtros   | 8. Porta série – zona posterior (em cima à esquerda, por trás da chapa de cobertura)   |
| 4. Depósito para sal de regeneração (descalcificador de água)                      |  |
| 5. Tampa de inspeção   |  |

Figura 3.1 - Descrição da máquina Miele G 7835 CD [55]





- |  |   |
|--|---|
| 1. Unidade lateral   | 8. Braço superior de pulverização da máquina                |
| 2. Reservatórios para produto neutralizador (vermelho) e detergente líquido (azul) | 9. Conexões de água para unidades móveis e cestos           |
| 3. Unidade de secagem  | 10. Braço inferior de pulverização da máquina               |
| 4. Trilhos para cestos e unidades móveis   | 11. Parte traseira da máquina: Conexões elétricas e de água |
| 5. Fechadura da porta da máquina   | 12. Combinação de filtros                                   |
| 6. Ponto de teste para verificações de desempenho                                  | 13. Porta de abertura e fecho da máquina                    |
| 7. Módulo de encaixe para um módulo de comunicação                                 | 14. Reservatório de sal de regeneração                      |

Figura 3.2 - Descrição da máquina Miele PG 8583 CD [56]

O procedimento da qualificação de *performance* executou-se com os três equipamentos em funcionamento, utilizando as condições de trabalho habituais.

É de notar que a capacidade de limpeza de cada máquina se encontra inquestionavelmente dependente do tipo e dimensão do material, tempo médio da incidência dos jatos, pressão e velocidade de lavagem. Torna-se então necessário conhecer quais os programas de lavagem adotados por cada máquina (Tabela 3.7) e quais as suas características (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 - Características dos programas de lavagem utilizados por cada máquina

	Fase do programa de lavagem	Modelo/Programas de lavagem				
		G7733	G7835CD	PG8583CD		
				1	2	3
Pré-lavagem	Circulação de água fria	X	X	-	X	X
	Circulação de água quente	50°C	50°C	-	X	X
	Mudança de água	X	X	-	-	-
	Circulação de água quente	50°C	50°C	-	-	-
Lavagem principal	Circulação de água quente	50°C	50°C	-	-	-
	Mudança de água	X	X	-	-	-
	Circulação água quente com detergente	50°C	50°C	60°C	60°C	60°C
	Mudança de água	X	X	X	-	-
	Circulação água quente com detergente	-	-	60°C	-	-
	Circulação de água quente	50°C	50°C	-	-	-
	Circulação água fria	X	X	-	-	-
Enxaguamento intermédio	Circulação água fria com neutralizador	X	X	-	-	-
	Circulação água quente com neutralizador	50°C	50°C	60°C	60°C	60°C
	Mudança de água	X	X	X	X	-
	Circulação com água quente	-	-	X	X	-
	Circulação de água quente com neutralizador	50°C	50°C	-	-	-
	Circulação de água fria com neutralizador	X	X	-	-	-
	Circulação de água purificada fria	X	X	X	X	X
	Mudança de água	X	X	-	-	X
	Circulação de água purificada fria	X	X	-	-	X
Enxaguamento final	Circulação de água purificada fria	X	X	-	-	
	Circulação de água purificada quente	50°C	50°C	60°C	60°C	60°C
Secagem	Condensação do vapor	-	50°C	-	-	-
	Secagem	-	50°C	60°C	60°C	60°C

Tabela 3.7 - Identificação das máquinas de lavar e respetivos programas de lavagem

Marca / Modelo	Programas de lavagem	Localização
Miele G 7835 CD	LAB-STANDAR nº 50	Sala lavagem FQ
Miele PG 8583 CD	1 – ORGÂNICA (remoção de resíduos orgânicos como óleos, gorduras, ceras, agar, etc – média a muita sujidade)  2 – UNIVERSAL (remoção de resíduos orgânicos e condicionalmente resíduos inorgânicos – pouca a média sujidade)  3 – PIPETAS	Sala lavagem FQ
Miele G7733	2xH <sub>2</sub> O PUR	Sala lavagem Micro

### 3.1.7 Contaminação do material

Como já foi referido no planeamento da qualificação, o material antes de ser submetido à lavagem nas máquinas tem de ser contaminado, de modo a testar-se a eficácia da remoção de resíduos contaminantes. Assim, introduz-se o volume de solução contaminante (especificado na tabela 3.8) sobre o material a ensaiar, efetuando-se o procedimento descrito a seguir:

- **Balões volumétricos:** introduz-se 40,0 ml de solução contaminante em cada proveta de 50,0 ml e passa-se o volume fixado pelos balões, começando pelos de maior volume.
- **Pipetas aferidas:** introduz-se 50,0 ml de solução contaminante em cada proveta de 50,0 ml e procede-se à passagem do volume fixado na tabela 3.8, com duas cargas de solução em cada pipeta, começando pelas de menor volume e devolvendo a solução à proveta.
- **Tubos de ensaio:** introduz-se 10,0 ml de solução contaminante num tubo, agitando-se 10 segundos e passando a solução para o tubo seguinte, até completar o procedimento nos dez tubos.
- **Copos de polipropileno:** introduz-se 40,0 ml de solução contaminante no copo de maior volume, agita-se 10 segundos e procede-se à transferência da solução para o de menor volume. Repete-se o procedimento anterior.
- **Copos de filtração:** introduz-se 40,0 ml de solução contaminante no copo, agita-se 10 segundos e procede-se à transferência da solução.
- **Frascos e almofarizes:** introduz-se 40,0 ml de solução contaminante nos frascos de maior volume, agita-se 10 segundos e procede-se à transferência da solução para o de menor volume. Repete-se o procedimento anterior.
- **Espátulas, pinças e tampas:** passar 10,0 ml da solução contaminante pelo material.

A impregnação do material com as soluções contaminantes é executada do seguinte modo:

- **Balões e frascos:** tapa-se com as respectivas tampas e agita-se manualmente, assegurando assim uma distribuição uniforme da solução para total impregnação.
- **Pipetas:** aspira-se duas vezes a solução contaminante.
- **Provetas, copos de filtração e copos de polipropileno:** agita-se manualmente com gestos circulares impregnando toda a superfície.
- **Espátulas e pinças:** mergulha-se o material na solução.

Tabela 3.8 - Volume de solução contaminante necessário para a contaminação do material

Máquina de lavagem de microbiologia MIELE G7733	Volume de solução contaminante (ml)	
	Proveta 50,0 (1)	Proveta 50,0 (2)
Tubos de ensaio 30,0 ml (x 10 un)	10,0 (x10)	
Copos de polipropileno 50,0 (x2) e 250 (x2) ml	40,0	
Copos de filtração 300 ml	40,0	-
Copos de filtração 300 ml	-	40,0
Almofariz e pilão	40,0	-
Almofariz e pilão	-	40,0
Frascos 100 mL	40,0	-
Frascos 100 mL	-	40,0
Frascos 1000 mL	40,0	-
Frascos 1000 mL	-	40,0
Frascos 2000 mL	40,0	-
Frascos 2000 mL	-	40,0
Espátulas (x2) e pinças (x2)	10,0	
Máquinas de lavagem MIELE G7835CD	Volume de solução contaminante (ml)	
	Proveta 50,0 (1)	Proveta 50,0 (2)
Balão volumétrico 1000,0 ml (1)	40,0	-
Balão volumétrico 1000,0 ml (2)	-	40,0
Balão volumétrico 10,0 ml (1)	10,0	-
Balão volumétrico 10,0 ml (2)	-	10,0

Tabela 3.8 - Volume de solução contaminante necessário para a contaminação do material (continuação)

Proveta 50,0 ml (1)	40,0	-
Proveta 50,0 ml (2)	-	40,0
Pipeta graduada 5,0 ml (1)	1,0 (x2)	-
Pipeta graduada 5,0 ml (2)	-	1,0 (x2)
Pipeta graduada 10,0 ml (1)	10,0 (x2)	-
Pipeta graduada 10,0 ml (2)	-	10,0 (x2)
Pipeta diferencial 20,0 ml (1)	20,0 (x2)	-
Pipeta diferencial 20,0 ml (2)	-	20,0 (x2)
Pipeta diferencial 50,0 ml (1)	50,0 (x2)	-
Pipeta diferencial 50,0 ml (2)	-	50,0 (x2)
Tubos de ensaio 30,0 ml (x 10 un)	10,0 (x10)	
Copos de polipropileno 50,0 (x2) e 250 (x2) ml	40,0	
Espátulas (x2) e pinças (x2)	10,0	
<b>Máquinas de lavagem</b>	<b>Volume de solução contaminante (ml)</b>	
<b>MIELE PG8583CD</b>	<b>Proveta 50,0 (1)</b>	<b>Proveta 50,0 (2)</b>
Balão volumétrico 1000,0 ml (1)	40,0	-
Balão volumétrico 1000,0 ml (2)	-	40,0
Balão volumétrico 10,0 ml (1)	10,0	-
Balão volumétrico 10,0 ml (2)	-	10,0
Proveta 50,0 ml (1)	40,0	-
Proveta 50,0 ml (2)	-	40,0
Pipeta graduada 5,0 ml (1)	1,0 (x2)	-
Pipeta graduada 5,0 ml (2)	-	1,0 (x2)
Pipeta graduada 10,0 ml (1)	10,0 (x2)	-
Pipeta graduada 10,0 ml (2)	-	10,0 (x2)

O material impregnado, e depois de seco, é colocado diretamente na máquina de lavar utilizando, para cada caso, o acessório adequado a cada tipo de material:

- **Balões volumétricos e frascos:** colocados de maneira a que a saída de água não possa ser obstruída pelo fundo do mesmo
- **Pipetas aferidas:** colocadas no suporte conforme indicado pelo fabricante
- **Tampas e tubos de ensaio:** colocadas no acessório para tubos de ensaio
- **Provetas, copos de filtração e copos de polipropileno:** colocados no local adequado de modo a que a saída de água não possa ser obstruída
- **Espátulas e pinças:** colocados na vertical de modo a não ficar com vestígios de água

Uma vez terminado o programa de lavagem e com material bem seco, procede-se à extração do resíduo a analisar.

### **3.1.8 Enxaguamento após lavagem - Preparação das soluções amostra**

A amostragem por enxaguamento envolve a recolha de um líquido que está em contacto com a superfície a amostrar e que escorre sob a mesma. Ou seja, o enxaguamento trata-se de um método de amostragem que permite avaliar a eficiência da lavagem, através da recolha de resíduos à superfície do material (como substâncias contaminantes, substâncias ativas e detergentes), casos estes estejam presentes.

#### **Preparação das soluções amostra**

Após a lavagem do material, este é submetido a um enxaguamento de forma a extrair resíduos contaminantes que possam estar presentes.

Este procedimento de extração depende da substância com que se contaminou o material, sendo para cada uma delas efetuado de forma diferente. Os diferentes procedimentos de extração estão indicados nas tabelas seguintes.

#### **Sulfametoxazol**

O solvente indicado para a solubilização do sulfametoxazol é a fase móvel (água acidificada a pH 2,5 e acetonitrilo, na proporção 65:35), logo é com esta solução que o enxaguamento vai ser realizado.

Tabela 3.9 - Procedimento de extração do sulfametoxazol, após o processo de lavagem

Material	Procedimento de extração
<b>Balões volumétricos:</b>  10,0 ml  1000,0 ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>Introduzir um volume de fase móvel igual ao volume da solução contaminante e agitar manualmente cerca de 30 segundos: 10,0 ml 40,0 ml</li> <li>(Repetir o procedimento para cada um dos balões)</li> </ul>
<b>Pipetas aferidas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Introduzir num copo limpo e enxaguado previamente com fase móvel, o volume nominal de cada pipeta. Executar duas vezes a operação de enchimento e descarga de cada pipeta;</li> <li>Enxaguar o copo com fase móvel nova antes de cada extração. (Repetir o procedimento para cada pipeta)</li> </ul>
<b>Provetas de 50 ml</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Introduzir 25 ml de fase móvel e agitar manualmente cerca de 30 segundos.</li> <li>Assegurar que toda a superfície da proveta é enxaguada. (Repetir o procedimento para cada proveta)</li> </ul>
<b>Tubos de ensaio 30 ml</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Introduzir 10 ml de fase móvel e agitar cerca de 30 segundos no vortex.</li> <li>Assegurar que toda a superfície do tubo é enxaguada. (Repetir o procedimento para cada tubo)</li> </ul>
<b>Copos de polipropileno</b>  50 ml  250 ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>Introduzir 25 ml de fase móvel e agitar manualmente cerca de 30 segundos.</li> <li>Assegurar que toda a superfície dos copos é enxaguada. (Repetir o procedimento para cada copo)</li> </ul>
<b>Copos de filtração 300 ml</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Introduzir 25 ml de fase móvel e agitar manualmente cerca de 30 segundos.</li> <li>Assegurar que toda a superfície dos copos é enxaguada.</li> </ul>
<b>Frascos:</b>  100 ml 1000 ml 2000 ml <b>Almofariz e pilão</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Introduzir um volume de fase móvel igual ao volume da solução contaminante e agitar manualmente cerca de 30 segundos: 40,0 ml</li> <li>(Repetir o procedimento para cada um)</li> </ul>
<b>Espátulas e pinças</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Passar 10 ml de fase móvel no material.</li> <li>Assegurar que toda a superfície dos materiais é enxaguada.</li> </ul>

As águas obtidas do enxaguamento são devidamente identificadas com o material a que pertencem e colocadas diretamente nos *vials* para HPLC.

## Cloreto de Sódio e Neodisher FLA

O cloreto de sódio e neodisher FLA são duas substâncias que apresentam uma elevada solubilidade em água, portanto para o enxaguamento do material contaminado com estes dois compostos utiliza-se água purificada.

As duas substâncias são detetadas através do mesmo método analítico, como tal o procedimento de extração destas no material lavado é também idêntico.

Tabela 3.10 - Procedimento de extração do cloreto de sódio e neodisher FLA, após o processo de lavagem

Material	Procedimento de extração
<b>Balões volumétricos:</b>  10,0 ml  1000,0 ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Numa proveta de 50 ml, previamente enxaguada 5 vezes com água purificada, introduzir o volume de água purificada correspondente ao volume do balão a ensaiar e determinar a condutividade;</li> <li>• Adicionar a água ao balão: <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Balão de 10,0 ml: 10,0 ml</li> <li>❖ Balão de 1000,0 ml: 40 ml</li> </ul> </li> </ul> <p>Enxaguar durante 30 segundos (assegurar que toda a superfície do balão é enxaguada) e transferir a água para outra proveta de 50 ml, previamente enxaguada 5 vezes com água purificada;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Determinar diretamente a condutividade da solução obtida;</li> <li>▪ Repetir o procedimento para cada um dos balões.</li> </ul>
<b>Pipetas aferidas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Introduzir num copo limpo e previamente enxaguado 5 vezes com água purificada, o volume nominal de cada pipeta de água purificada e determinar a condutividade;</li> <li>▪ Executar duas vezes a operação de enchimento e descarga da pipeta;</li> <li>▪ Determinar diretamente a condutividade da solução obtida;</li> <li>▪ Repetir o procedimento com cada uma das pipetas.</li> </ul>
<b>Provetas de 50 ml</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Introduzir 25 ml de água purificada numa proveta de 50 ml, previamente enxaguada 5 vezes com água purificada e determinar a condutividade;</li> <li>▪ Transferir a água para a proveta em ensaio e agitar manualmente cerca de 30 segundos (assegurar que toda a superfície da proveta é enxaguada);</li> <li>▪ Determinar diretamente a condutividade da solução obtida;</li> <li>▪ Repetir o procedimento com cada uma das provetas.</li> </ul>
<b>Tubos de ensaio 30 ml</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Numa proveta de 25 ml, previamente enxaguada 5 vezes com água purificada, introduzir 25 ml de água purificada e determinar a condutividade;</li> <li>▪ Transferir a água para o tubo de ensaio e agitar cerca de 30 segundos no <i>vortex</i> (assegurar que toda a superfície do tubo é enxaguada);</li> <li>▪ Determinar diretamente a condutividade da solução obtida;</li> <li>▪ Repetir o procedimento para cada um dos tubos de ensaio.</li> </ul>
<b>Copos de polipropileno</b>  50 e 250 ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Numa proveta de 50 ml, previamente enxaguada 5 vezes com água purificada, introduzir 40 ml de água purificada e determinar a condutividade;</li> <li>▪ Transferir a água purificada e agitar manualmente cerca de 30 segundos (assegurar que toda a superfície dos copos é enxaguada);</li> <li>▪ Determinar diretamente a condutividade da solução obtida;</li> <li>▪ Repetir o procedimento para o copo de 1000 ml.</li> </ul>
<b>Copos de filtração</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Numa proveta de 50 ml, previamente enxaguada 5 vezes com água purificada, introduzir 40 ml de água purificada e determinar a condutividade;</li> <li>▪ Transferir a água purificada e agitar manualmente cerca de 30 segundos (assegurar que toda a superfície dos copos é enxaguada);</li> <li>▪ Determinar diretamente a condutividade da solução obtida;</li> </ul>



Tabela 3.10 - Procedimento de extração do cloreto de sódio e neodisher FLA, após o processo de lavagem (continuação)

<b>Frascos:</b>  100 ml  1000ml  2000 ml  <b>Almofariz e pilão</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Numa proveta, previamente enxaguada 5 vezes com água purificada, introduzir o volume de água purificada correspondente ao volume do frasco a ensaiar e determinar a condutividade;</li> <li>• Juntar a 40,0 ml de água ao frasco;</li> <li>• Enxaguar durante 30 segundos (assegurar que toda a superfície do balão é enxaguada) e transferir a água para outra proveta de 50 ml, previamente enxaguada 5 vezes com água purificada;</li> <li>▪ Determinar diretamente a condutividade da solução obtida;</li> <li>▪ Repetir o procedimento para cada um dos frascos e almofariz e pilão.</li> </ul>
<b>Espátulas e pinças</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Numa proveta de 25 ml, previamente enxaguada 5 vezes com água purificada, introduzir 10 ml de água purificada e determinar a condutividade;</li> <li>▪ Passar a água pelo material e recolher a água para outra proveta de 25 ml, previamente enxaguada 5 vezes com água purificada;</li> <li>▪ Determinar diretamente a condutividade da solução obtida;</li> <li>▪ Repetir o procedimento para cada um dos materiais.</li> </ul>

### Neodisher Z e Labwash

Tanto o neodisher Z como o Labwash são solúveis em água, sendo esta utilizada como solvente para efetuar o enxaguamento.

Estas duas substâncias são detetadas pelo mesmo método analítico, apresentando também o mesmo procedimento de extração do material lavado.

Tabela 3.11 - Procedimento de extração do Neodisher Z e Labwash, após o processo de lavagem

Material	Procedimento de extração
<b>Balões volumétricos:</b>  10,0 ml  1000,0 ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Introduzir um volume de água purificada igual ao volume da solução contaminante e agitar manualmente cerca de 30 segundos: 10,0 ml  40,0 ml  (Repetir o procedimento para cada um dos balões)</li> </ul>
<b>Pipetas aferidas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Introduzir num copo limpo e enxaguado previamente com água purificada o volume nominal de cada pipeta. Executar duas vezes a operação de enchimento e descarga de cada pipeta;</li> <li>• Enxaguar o copo com água purificada nova antes de cada extração. (Repetir o procedimento para cada pipeta)</li> </ul>
<b>Provetas de 50 ml</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Introduzir 25 ml de água purificada e agitar manualmente cerca de 30 segundos.</li> <li>• Assegurar que toda a superfície da proveta é enxaguada. (Repetir o procedimento para cada proveta)</li> </ul>

Tabela 3.11 - Procedimento de extração do Neodisher Z e Labwash, após o processo de lavagem (continuação)

<b>Tubos de ensaio 30 ml</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Introduzir 10 ml de água purificada e agitar cerca de 30 segundos no vortex.</li> <li>• Assegurar que toda a superfície do tubo é enxaguada. (Repetir o procedimento para cada tubo)</li> </ul>
<b>Copos de polipropileno</b>  50 ml 250 ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Introduzir 25 ml de água purificada e agitar manualmente cerca de 30 segundos.</li> <li>• Assegurar que toda a superfície dos copos é enxaguada. (Repetir o procedimento para cada copo)</li> </ul>
<b>Copos de filtração 300 ml</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Introduzir 25 ml de água purificada e agitar manualmente cerca de 30 segundos.</li> <li>• Assegurar que toda a superfície dos copos é enxaguada.</li> </ul>
<b>Frascos:</b>  100 ml 1000 ml 2000 ml <b>Almofariz e pilão</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Introduzir um volume de água purificada igual ao volume da solução contaminante e agitar manualmente cerca de 30 segundos: 40,0 ml</li> <li>• (Repetir o procedimento para cada um)</li> </ul>
<b>Espátulas e pinças</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Passar 10 ml de água purificada no material.</li> <li>• Assegurar que toda a superfície dos materiais é enxaguada.</li> </ul>

As soluções obtidas do enxaguamento do material vão ser colocadas diretamente em *vials* para serem analisadas no aparelho TOC.

### 3.2 Validação do método analítico por HPLC – Sulfametoxazol

De forma a detetar a presença do sulfametaxol após a lavagem do material nas máquinas de lavar (Miele G 7835 CD, Miele PG 8583 CD e Miele G 7733) deve recorrer-se à utilização de um método analítico específico, a cromatografia líquida de alta eficiência. Como tal é necessário que este método esteja validado para esta substância.

A validação tem como objetivo determinar, em percentagem, a quantidade exata de sulfametoxazol recuperada das respetivas soluções, tendo em conta uma quantidade previamente conhecida. Pretende também estabelecer-se uma evidência documental de que o procedimento analítico conduz, com elevado grau de segurança, à obtenção de resultados precisos e exatos, dentro dos limites de contaminação residuais pré-estabelecidos, garantindo a fiabilidade dos resultados analíticos.

### 3.2.1 Materiais e equipamentos

#### Equipamentos

- Balança Metler MX5
- Cyberscan pH 2000
- Sistema de HPLC (Waters 6 e Waters 7)
- Placa de aquecimento e agitação
- Banho de ultrassons

#### Materiais

- Material de pesagem, espátulas e "barquinhas" de pesagem
- Frascos (*vials*) e septos para HPLC
- Agitador magnético
- Micropipeta 10-100 µl
- Material volumétrico - Classe A
- Material diverso de laboratório

#### Reagentes

- Padrão de sulfametoxazol
- Acetonitrilo para HPLC
- Água purificada
- Ácido trifluoroacético
- Detergente *Labwash*
- Detergente *Neodisher FLA*

### 3.2.2 Condições cromatográficas

A obtenção das condições cromatográficas ótimas para a execução da validação teve por base o método adotado pela farmacopeia europeia para a determinação de substâncias relacionadas do sulfametoxazol [57].

Tabela 3.12 - Condições cromatográficas adotadas pela farmacopeia europeia

<b>Fase móvel</b>	Solução tampão de hidrogeno fosfato de potássio (13,6 g/L) com pH ajustado a 5.3 com uma solução de hidróxido de potássio (20 g/L) : Metanol (65:35)
<b>Coluna</b>	Octil (C8) (5 µm) (250 x 4 mm)
<b>Temperatura da coluna</b>	30 °C
<b>Fluxo</b>	0,9 mL / minuto
<b>Volume de injeção</b>	20 µL
<b>Deteção</b>	UV a 210 nm
<b>Tempos de corrida</b>	3 x o tempo de retenção do sulfametoxazol
<b>Solução de lavagem da válvula de injeção</b>	Água : metanol (1:1)

Aplicando as condições cromatográficas anteriores não foi possível detetar a presença da substância de interesse. O principal problema residia no aparecimento de um precipitado na fase móvel devido à solução tampão de hidrogeno fosfato de potássio.

Depois de algumas experiências e alterações ao método inicial, foram então encontradas as condições cromatográficas desejáveis para detetar o sulfametoxazol na concentração pretendida (1 µg/mL).

Tabela 3.13 - Condições cromatográficas utilizadas na validação

<b>Fase móvel</b>	Água acidificada (pH 2.5, C <sub>2</sub> HF <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ): Acetonitrilo (65:35)
<b>Coluna</b>	Lichrospher 100 RP18 (5 µm) (250 x 4 mm) Merck (art. 1.50833)
<b>Temperatura da coluna</b>	30 °C
<b>Fluxo</b>	0,7 mL / minuto
<b>Volume de injeção</b>	50 µL
<b>Deteção</b>	UV a 270 nm
<b>Tempos de corrida</b>	10 minutos
<b>Solução de lavagem da válvula de injeção</b>	Água : metanol (1:1)

### 3.2.3 Preparação das soluções

#### Soluções padrão de Sulfametoxazol (A), (B) e (C):

Introduziu-se 5, 10 e 15 mg de Sulfametoxazol padrão, exatamente pesados, para balões volumétricos de 100 ml. Dissolveu-se e completou-se o volume com fase móvel. Agitou-se, homogeneizou-se e transferiu-se 1 ml de cada uma das soluções anteriores para balões volumétricos de 100 ml. Por fim, completou-se o volume com fase móvel.

#### Fase móvel

A fase móvel consiste na mistura de água acidificada e acetonitrilo. Para acidificar a água encheu-se um recipiente com água purificada e adicionou-se umas gotas de ácido trifluoroacético

de modo a baixar o pH para o valor de 2,5 (esta adição decorreu sob agitação). De seguida misturou-se a água acidificada com o acetonitrilo, na proporção de 65:35 (v/v). Por fim, a mistura obtida foi colocada no banho de ultrassons para promover a desgaseificação da solução.

- **Seletividade**

**Solução de Sulfametoxazol (C=0,001 mg/ml):**

Pesou-se rigorosamente 10 mg de Sulfametoxazol para um balão de 100 ml. Adicionou-se fase móvel e colocou-se nos ultrassons durante cerca de 15 minutos até a substância estar completamente dissolvida. Perfez-se o volume do balão com o mesmo solvente e agitou-se de modo a homogeneizar a solução. Por fim transferiu-se 1 ml da solução anterior para um balão de 100 ml e completou-se o volume com fase móvel.

**Solução de Labwash (C=0,001 mg/ml):**

Adicionou-se, rigorosamente, 10 mg de Labwash para um balão de 100 ml. Perfez-se o volume com fase móvel e agitou-se de forma a homogeneizar a solução. Transferiu-se 1 ml da solução preparada para um balão de 100 ml e completou-se o volume com o mesmo solvente.

**Solução de Neodisher FLA (C=0,001 mg/ml):**

Introduziu-se cerca de 15 µl de Neodisher FLA (o equivalente a 20 mg) para um balão de 200 ml. Perfez-se o volume com fase móvel e agitou-se a solução. Transferiu-se 1 ml da solução anterior para um balão de 100 ml e completou-se o volume com o mesmo solvente.

**Solução “placebo” reforçada:**

Pesou-se rigorosamente 20 mg de Labwash, 20 mg de Sulfametoxazol e 15 µl de Neodisher FLA para um balão de 200 ml. Adicionou-se fase móvel e colocou-se nos ultrassons durante cerca de 15 minutos. Perfez-se o volume com o mesmo solvente e agitou-se a solução obtida. Por fim, transferiu-se 1 ml da solução anterior para um balão de 100 ml e completou-se o volume com fase móvel.

- **Linearidade**

#### **Soluções padrão de Sulfametoxazol:**

Tabela 3.14 - Preparação das soluções para o ensaio da linearidade

<b>*Teor (%)</b>	<b>Concentração sulfametoxazol (µg/ml)</b>	<b>Peso sulfametoxazol (mg)</b>	<b>Volume (ml)</b>	<b>Aliquota da solução anterior (ml)</b>	<b>Volume final (ml)</b>
50	0,50	10	100	0,5	100
75	0,75			1,5	200
100	1,00			1	100
125	1,25			2,5	200
150	1,50			1,5	100

\*Teor calculado em relação à concentração teórica da amostra

Inicialmente pesou-se 10 mg de sulfametoxazol para um balão volumétrico de 100 ml. Adicionou-se fase móvel e colocou-se nos ultrassons cerca de 15 minutos. Perfez-se o volume e agitou-se de modo a homogeneizar a solução.

A partir desta solução foram feitas diluições para se obter as soluções com os diferentes teores pretendidos. Como tal, transferiu-se as alíquotas da solução preparada para balões de 100 e 200 ml, tal como especificado na tabela. De seguida acrescentou-se fase móvel a todas elas, até perfazer o volume, e agitou-se.

- **Limite de detecção e quantificação**

#### **Soluções de sulfametoxazol (C=0.5%, C=1%, C=1,5%)**

Para o cálculo destes limites foram preparadas 3 soluções a 0.5, 1 e 1.5% (concentrações que se pensava serem próximas do limite de quantificação). Como tal, foi necessário pesar rigorosamente 5, 10 e 15 mg de sulfametoxazol para balões volumétricos de 100 ml, adicionando fase móvel e colocando no banho de ultrassons durante cerca de 15 minutos. De seguida completou-se o volume com o mesmo solvente, agitou-se e homogeneizou-se as soluções. Transferiu-se 1 ml de cada uma das soluções para balões de 100 ml e completou-se o volume. Por fim, transferiu-se de novo 1 ml de cada uma das soluções anteriores para balões de 100 ml e perfez-se o volume com a fase móvel, agitando e homogeneizando as soluções.

- **Exatidão**

Para o cálculo da exatidão foram utilizadas as soluções padrão de sulfametoxazol (A), (B), e (C) descritas acima e 3 soluções placebo com sulfametoxazol, preparadas de acordo com a tabela 3.15.

**Soluções placebo com sulfametoxazol:**

Tabela 3.15 - Preparação das soluções placebo com sulfametoxazol

*Teor (%)	Concentração sulfametoxazol (µg/ml)	Peso sulfametoxazol padrão (mg)	Peso de Neodisher FLA (µl)	Peso de Labwash (mg)	Volume (ml)	Alíquota da Solução anterior (ml)	Volume final (ml)
50	0,50	20	15	20	200	0,5	100
100	1,00	20	15	20	200	1	100
150	1,50	20	15	20	200	1,5	100

\*Teor calculado em relação à concentração teórica da amostra

Para preparar cada uma das soluções placebo pesou-se, exatamente, 20 mg de Sulfametoxazol, 15 µl de Neodisher FLA e 20 mg de Labwash para um balão volumétrico de 200 ml. Adicionou-se fase móvel e colocou-se nos ultrassons de modo a dissolver todas as substâncias. De seguida completou-se o volume do balão com o mesmo solvente e agitou-se. De forma a obter as diluições pretendidas, transferiu-se as alíquotas das soluções anteriores para balões de 100 ml e completou-se o volume com fase móvel.

- **Precisão**

**Repetibilidade**

Para o ensaio da repetibilidade foram utilizadas as soluções padrão de sulfametoxazol (A), (B) e (C) e a solução placebo com sulfametoxazol a 100%, preparada no ensaio da exatidão.

**Precisão intermédia**

Os ensaios foram realizados por 2 analistas diferentes, em dois dias diferentes e em 2 equipamentos diferentes, conforme o seguinte esquema:

Tabela 3.16 - Esquema representativo da execução de precisão intermédia

<b>Analista X</b>	Instrumento A	Dia 1
	Instrumento B	Dia 2
<b>Analista Y</b>	Instrumento A	Dia 1
	Instrumento B	Dia 2

Cada analista:

- Preparou 3 soluções placebo com sulfametoxazol a 100%, de acordo com a preparação descrita na exatidão (Tabela 3.15).
- Utilizou as soluções padrão de sulfametoxazol (A), (B) e (C).

- **Adequabilidade do sistema (SST – System Suitability Tests)**

No estudo da adequabilidade do sistema utilizou-se a solução padrão de sulfametoxazol a 100%

- Solução (B).

Este estudo foi efetuado em 2 sistemas cromatográficos diferentes.

- **Robustez**

Para o ensaio da robustez foram utilizadas as soluções padrão de sulfametoxazol (A), (B) e (C) e a solução placebo com sulfametoxazol a 100%, preparada no ensaio da exatidão.

Como já foi referido na introdução, este ensaio teve como base os desenhos fatoriais de Plackett-Burman, em que foram efetuados 8 ensaios, fazendo variar 7 fatores.

De forma a efetuar este ensaio é necessário estabelecer os parâmetros nominais de análise (parâmetros esses que foram utilizados para efetuar todos os outros ensaios da validação). A partir desses parâmetros são feitas pequenas alterações, um nível acima e um nível abaixo, para cada fator avaliado.

Os diferentes fatores estudados e os respetivos valores/níveis que podem admitir são os seguintes:

Tabela 3.17 - Fatores e níveis experimentais

Fator	Nível +	Valor nominal	Nível -
Percentagem de acetonitrilo na fase móvel (%)	45	35	25
Volume de injeção (µL)	60	50	40
pH da fase móvel	3	2,5	2
Temperatura da coluna (°C)	35	30	25
Deteção eletroquímica (nm)	280	270	260
Fluxo (mL/min)	0,8	0,7	0,6
Coluna utilizada	Em uso Art. 1.50212	Em uso Art. 1.50833	Em uso Art. 1.50833



Aplicando a matriz presente na figura 2.3, temos:

Tabela 3.18 - Matriz utilizada no ensaio da robustez

Ensaio	Fatores a avaliar						
	Percentagem de acetonitrilo na fase móvel (%)	Volume de injeção (µl)	pH da fase móvel	Temperatura da coluna (°C)	Deteção eletroquímica (nm)	Fluxo (ml/min)	Coluna utilizada
1	45	40	2,0	35	280	0,6	Em uso [Lichrospher 100 RP18 (5µm) (250x4mm) Merck (art 1.50212)]
2	45	60	2,0	25	260	0,8	Em uso [Lichrospher 100 RP18 (5µm) (250x4mm) Merck (art 1.50212)]
3	45	60	3,0	25	280	0,6	Em uso [Lichrospher 100 RP18 (5µm) (250x4mm) Merck (art 1.50833)]
4	25	60	3,0	35	260	0,6	Em uso [Lichrospher 100 RP18 (5µm) (250x4mm) Merck (art 1.50212)]
5	45	40	3,0	35	260	0,8	Em uso [Lichrospher 100 RP18 (5µm) (250x4mm) Merck (art 1.50833)]
6	25	60	2,0	35	280	0,8	Em uso [Lichrospher 100 RP18 (5µm) (250x4mm) Merck (art 1.50833)]
7	25	40	3,0	25	280	0,8	Em uso [Lichrospher 100 RP18 (5µm) (250x4mm) Merck (art 1.50212)]
8	25	40	2,0	25	260	0,6	Em uso [Lichrospher 100 RP18 (5µm) (250x4mm) Merck (art 1.50833)]

- **Estabilidade das soluções**

No estudo da estabilidade das soluções foram utilizadas as soluções padrão de sulfametoxazol (A), (B) e (C) e a solução placebo com sulfametoxazol a 100%, preparada no ensaio da exatidão.



## 4. Apresentação e discussão de resultados obtidos

### 4.1 Qualificação da performance das máquinas de lavagem de material

Nesta secção serão apresentados os resultados mais relevantes obtidos na qualificação da performance de cada uma das máquinas de lavar material.

Cada ensaio foi executado de modo independente e em duplicado (2 dias), segundo a metodologia mencionada no capítulo anterior.

#### 4.1.1 Miele G 7835 CD

##### a) TOC

- Contaminação por Labwash

Inicialmente começou-se por se efetuar o primeiro ensaio da contaminação por labwash e obtiveram-se os resultados listados na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Valores de TOC obtidos do enxaguamento do material contaminado com Labwash (Dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele G 7835 CD

Material de laboratório	TOC experimental* (ppb C)		Critério de aceitação
Branco (Água purificada)	57,1		≤ 500 ppb (≤ 0,5 mg/l)
Balão volumétrico 10,0 ml	738,9		
Balão volumétrico 10,0 ml	818,9		
Balão volumétrico 1000,0 ml	1072,9		
Balão volumétrico 1000,0 ml	728,9		
Proveta 50,0 ml	115,9		
Proveta 50,0 ml	144,9		
Pipeta graduada 5,0 ml	78,9		
Pipeta graduada 5,0 ml	185,9		
Pipeta graduada 10,0 ml	321,9		
Pipeta graduada 10,0 ml	181,9		
Pipeta diferencial 20,0 ml	88,9		
Pipeta diferencial 20,0 ml	359,9		
Pipeta diferencial 50,0 ml	68,9		
Pipeta diferencial 50,0 ml	113,9		
Copo polipropileno 50 ml	74,9		
Copo polipropileno 50 ml	92,9		
Copo polipropileno 250 ml	515,9		
Copo polipropileno 250 ml	626,9		
Tubos de ensaio 30 ml (10 unidades)	1: 406,9	6: 189,9	
	2: 368,9	7: 226,9	
	3: 433,9	8: 255,9	
	4: 122,9	9: 172,9	
	5: 380,9	10: 321,9	
Espátula	451,9		
Espátula	478,9		
Pinça	1422,9		
Pinça	503,9		

\*O valor de TOC experimental resulta da subtração do valor TOC do branco ao valor TOC de cada material

O aparelho *Sievers DataPro 900* calcula o valor de TOC pela diferença entre o valor de TC e IC. Na tabela anterior encontram-se apenas os valores de TOC finais, sendo que a tabela completa com os valores de TC, IC e TOC se encontra em anexo (A1 – Tabela A1.1).

Tendo em conta o valor limite estabelecido de 500 ppb, pode observar-se que existem alguns materiais que apresentam valores de TOC muito acima desse valor. O programa de lavagem da máquina Miele G 7835 CD não é eficaz na remoção do detergente labwash, deixando o material com resíduos de contaminante. Assim sendo, foi necessário averiguar a origem desta contaminação e tomar medidas que levassem à sua resolução.

Foi então construído um diagrama de Ishikawa com o objetivo de agrupar e visualizar as várias causas que poderão estar na origem do problema.

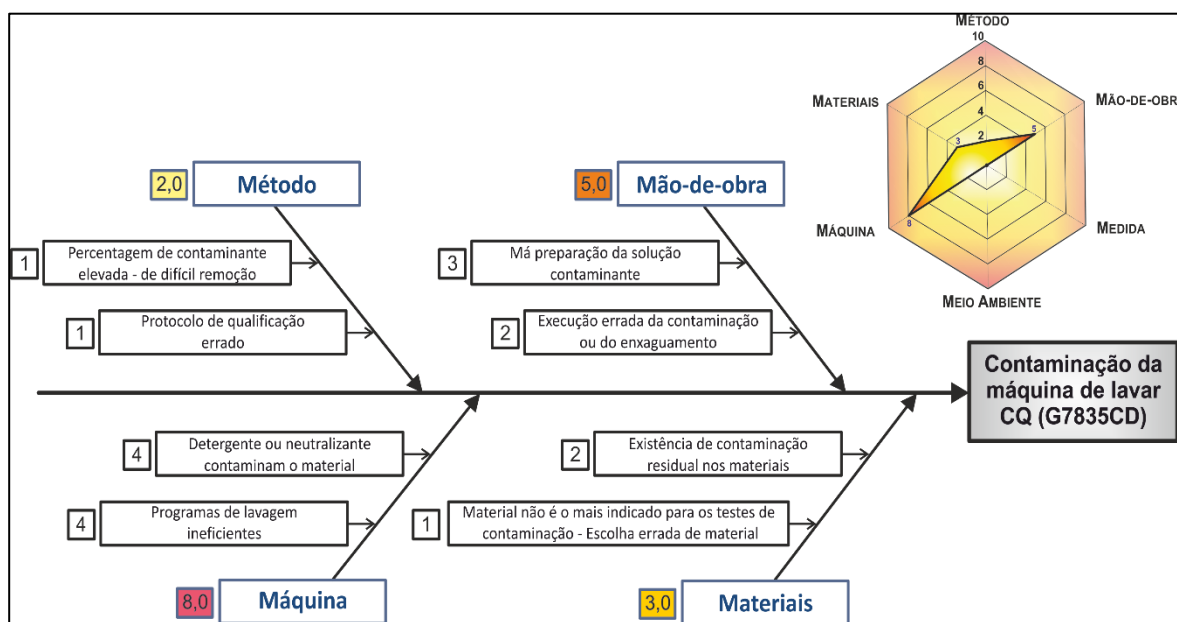


Figura 4.1 - Diagrama de Ishikawa para a contaminação da máquina de lavar G 7835 CD

Analisando o diagrama concluiu-se que a origem da contaminação estava muito provavelmente na máquina, uma vez que era o fator que apresentava um maior impacto no problema em questão, reunindo uma maior pontuação. Assim, o detergente (Neodisher FLA) ou o neutralizante (Neodisher Z) utilizados estavam a contaminar o material ou o programa de lavagem podia não estar planeado da forma mais eficiente.

Por forma a confirmar que a contaminação tinha origem efetivamente da máquina de lavar, foi efetuada uma lavagem do material em estudo, mas sem se proceder à contaminação do mesmo. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Valores de TOC obtidos do enxaguamento de material por contaminar e submetido à lavagem na máquina Miele G 7835 CD

Material de laboratório	TOC experimental* (ppb C)		Critério de aceitação
Branco (Água purificada)	87,7		≤ 500 ppb (≤ 0,5 mg/l)
Balão volumétrico 10,0 ml	16,3		
Balão volumétrico 10,0 ml	2,2		
Balão volumétrico 1000,0 ml	85,3		
Balão volumétrico 1000,0 ml	186,3		
Proveta 50,0 ml	10,5		
Proveta 50,0 ml	25,3		
Pipeta graduada 5,0 ml	868,3		
Pipeta graduada 5,0 ml	594,3		
Pipeta graduada 10,0 ml	376,3		
Pipeta graduada 10,0 ml	212,3		
Pipeta diferencial 20,0 ml	30,3		
Pipeta diferencial 20,0 ml	9,1		
Pipeta diferencial 50,0 ml	28,3		
Pipeta diferencial 50,0 ml	74,3		
Copo polipropileno 50 ml	1382,3		
Copo polipropileno 50 ml	1282,3		
Copo polipropileno 250 ml	486,3		
Copo polipropileno 250 ml	573,3		
Tubos de ensaio 30 ml (10 unidades)	1: 0,0 2: 6,9 3: 2,9 4: 11,1 5: 9,5	6: 9,5 7: 357,3 8: 393,3 9: 423,3 10: 451,3	
Espátula	474,3		
Espátula	155,3		
Pinça	910,3		
Pinça	618,3		

\*O valor de TOC experimental resulta da subtração do valor TOC do branco ao valor TOC de cada material

A tabela completa, com os valores de TC e IC para cada material, encontra-se em anexo (A1-Tabela A1.2).

Através da análise dos resultados obtidos, tornou-se evidente a presença de contaminação na máquina de lavar material. Esta teve origem ou no detergente ou no neutralizante utilizados, uma vez que o material foi introduzido na máquina completamente limpo, sem resíduos de contaminante algum.

Dado que o detergente Neodisher FLA é composto maioritariamente por hidróxido de sódio, apresentando quantidades reduzidas de carbono na sua constituição, este não é detetado pelo método analítico TOC. Por sua vez o neutralizante Neodisher Z é composto por ácido cítrico e detetado pelo TOC.

Era então muito provável que a contaminação estivesse relacionada com o neutralizante, como tal este foi substituído por água purificada de forma a estudar os efeitos produzidos nos resultados (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 - Valores de TOC obtidos do enxaguamento de material por contaminar e submetido à lavagem na máquina Miele G 7835 CD (Máquina injeta apenas detergente e água purificada)

Material de laboratório	TOC experimental* (ppb C)		Critério de aceitação
Branco (Água purificada)	219		≤ 500 ppb (≤ 0,5 mg/l)
Balão volumétrico 10,0 ml	353		
Balão volumétrico 10,0 ml	397		
Balão volumétrico 1000,0 ml	453		
Balão volumétrico 1000,0 ml	587		
Proveta 50,0 ml	0		
Proveta 50,0 ml	0		
Pipeta graduada 5,0 ml	23		
Pipeta graduada 5,0 ml	8		
Pipeta graduada 10,0 ml	0		
Pipeta graduada 10,0 ml	12		
Pipeta diferencial 20,0 ml	0		
Pipeta diferencial 20,0 ml	0		
Pipeta diferencial 50,0 ml	0		
Pipeta diferencial 50,0 ml	0		
Copo polipropileno 50 ml	31		
Copo polipropileno 50 ml	26		
Copo polipropileno 250 ml	249		
Copo polipropileno 250 ml	175		
Tubos de ensaio 30 ml (10 unidades)	1: 90 2: 0 3: 19 4: 40 5: 36	6: 0 7: 1 8: 19 9: 0 10: 13	
Espátula	101		
Espátula	157		
Pinça	521		
Pinça	580		

\*O valor de TOC experimental resulta da subtração do valor TOC do branco ao valor TOC de cada material

A tabela completa, com os valores de TC e IC para cada material, encontra-se em anexo (A1-Tabela A1.3).

Como se pode constatar pela tabela, os valores de TOC das águas de enxaguamento do material diminuíram bastante com a substituição do neutralizante neodisher z pela água purificada. A maioria do material já se encontra dentro dos limites estabelecidos e com valores baixos, à exceção de três deles que apresentam valores de TOC acima dos 500 ppb. Tal deve-se à possibilidade de ainda existirem vestígios de neodisher z nas tubagens e a realização de apenas uma purga não ter sido suficiente, o que não apresenta muita relevância devido aos valores não serem muito superiores ao limite.

Pode então concluir-se que de facto a contaminação estava a ser causada pelo neutralizante, sendo este substituído pela água purificada. Assim, com a sua eliminação do programa de lavagem da máquina este deixou de ser uma das substâncias contaminantes envolvidas no processo de qualificação.

Estando a máquina livre de contaminações, procedeu-se então à contaminação do material com o detergente Labwash, em dois dias consecutivos. Os resultados obtidos encontram-se nas tabelas 4.4 e 4.5

Tabela 4.4 - Valores de TOC obtidos do enxaguamento do material contaminado com Labwash (Dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele G 7835 CD

Material de laboratório	TOC experimental* (ppb C)		Critério de aceitação
Branco (Água purificada)	14,1		≤ 500 ppb (≤ 0,5 mg/l)
Balão volumétrico 10,0 ml	259,9		
Balão volumétrico 10,0 ml	235,9		
Balão volumétrico 1000,0 ml	454,9		
Balão volumétrico 1000,0 ml	388,9		
Proveta 50,0 ml	141,9		
Proveta 50,0 ml	186,9		
Pipeta graduada 5,0 ml	267,9		
Pipeta graduada 5,0 ml	321,9		
Pipeta graduada 10,0 ml	248,9		
Pipeta graduada 10,0 ml	207,9		
Pipeta diferencial 20,0 ml	191,9		
Pipeta diferencial 20,0 ml	166,9		
Pipeta diferencial 50,0 ml	124,9		
Pipeta diferencial 50,0 ml	144,9		
Copo polipropileno 50 ml	145,9		
Copo polipropileno 50 ml	161,9		
Copo polipropileno 250 ml	217,9		
Copo polipropileno 250 ml	226,9		
Tubos de ensaio 30 ml (10 unidades)	1: 219,9	6: 224,9	
	2: 127,9	7: 150,9	
	3: 140,9	8: 142,9	
	4: 151,9	9: 169,9	
	5: 174,9	10: 144,9	
Espátula	218,9		
Espátula	122,9		
Pinça	319,9		
Pinça	312,9		

\*O valor de TOC experimental resulta da subtração do valor TOC do branco ao valor TOC de cada material

Tabela 4.5 - Valores de TOC obtidos do enxaguamento do material contaminado com Labwash (Dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele G 7835 CD

Material de laboratório	TOC experimental* (ppb C)		Critério de aceitação
Branco (Água purificada)	15,7		≤ 500 ppb (≤ 0,5 mg/l)
Balão volumétrico 10,0 ml	71,4		
Balão volumétrico 10,0 ml	70,6		
Balão volumétrico 1000,0 ml	456,3		
Balão volumétrico 1000,0 ml	207,3		
Proveta 50,0 ml	113,3		
Proveta 50,0 ml	128,3		
Pipeta graduada 5,0 ml	273,3		
Pipeta graduada 5,0 ml	297,3		
Pipeta graduada 10,0 ml	310,3		
Pipeta graduada 10,0 ml	206,3		
Pipeta diferencial 20,0 ml	177,3		
Pipeta diferencial 20,0 ml	406,3		
Pipeta diferencial 50,0 ml	254,3		
Pipeta diferencial 50,0 ml	414,3		
Copo polipropileno 50 ml	289,3		
Copo polipropileno 50 ml	275,3		
Copo polipropileno 250 ml	346,3		
Copo polipropileno 250 ml	341,3		
Tubos de ensaio 30 ml (10 unidades)	1: 81,5	6: 71,2	
	2: 400,3	7: 53,7	
	3: 60,6	8: 50,1	
	4: 64,4	9: 71,2	
	5: 61,1	10: 55,8	
Espátula	112,3		
Espátula	62,6		
Pinça	468,3		
Pinça	346,3		

\*O valor de TOC experimental resulta da subtração do valor TOC do branco ao valor TOC de cada material

As tabelas completas, onde se apresentam os valores de TC, IC e TOC de cada material encontram-se em anexo (A1-Tabelas A1.4 e A1.5).

Os valores de TOC obtidos do enxaguamento do material contaminado com labwash e submetido ao processo de lavagem na máquina Miele G7835 CD estão todos abaixo do valor de 500 ppb, ou seja, conformes. É de notar que o programa de lavagem passou a ser constituído apenas pelo detergente Neodisher FLA, sendo o neutralizante substituído por água purificada. Assim, pode afirmar-se que o programa de lavagem da máquina é eficaz na remoção do detergente labwash, deixando o material com resíduos em níveis aceitáveis.

#### Pontos críticos:

De forma a efetuar uma análise o mais completa possível da máquina Miele G 7835 CD foi estudada a existência de pontos críticos. Como tal, foram utilizados dois tipos de materiais: balões volumétricos de 150 ml e pipetas graduadas de 25 ml, uma vez que cada um deles é inserido num suporte diferente, no interior da máquina.

O material foi contaminado com labwash e ensaiado três vezes, ou seja, foram feitas três máquinas com cada tipo de material e determinou-se quais os pontos críticos (pontos da máquina



em que o material apresenta, repetidamente, valores mais elevados de TOC). Os resultados obtidos encontram-se nas seguintes tabelas (Tabela 4.6 – 4.11).

- ✓ Balões volumétricos de 150 mL

Tabela 4.6 - Ensaio 1 para o estudo dos pontos críticos com balões volumétricos de 150 ml

	TC (ppb)	IC (ppb)	TOC (ppb)	TOC final (ppb)
<b>Branco</b>	170	149	20	
<b>Balão volumétrico 150 mL (1)</b>	698	296	402	382
<b>Balão volumétrico 150 mL (2)</b>	595	296	300	280
<b>Balão volumétrico 150 mL (3)</b>	635	295	340	320
<b>Balão volumétrico 150 mL (4)</b>	597	292	305	285
<b>Balão volumétrico 150 mL (5)</b>	541	284	257	237
<b>Balão volumétrico 150 mL (6)</b>	593	344	249	229
<b>Balão volumétrico 150 mL (7)</b>	540	310	231	211
<b>Balão volumétrico 150 mL (8)</b>	556	297	259	239

Tabela 4.7 - Ensaio 2 para o estudo dos pontos críticos com balões volumétricos de 150 ml

	TC (ppb)	IC (ppb)	TOC (ppb)	TOC final (ppb)
<b>Branco</b>	148	127	20,4	
<b>Balão volumétrico 150 mL (1)</b>	502	272	230	209,6
<b>Balão volumétrico 150 mL (2)</b>	730	286	444	423,6
<b>Balão volumétrico 150 mL (3)</b>	641	310	331	310,6
<b>Balão volumétrico 150 mL (4)</b>	665	292	373	352,6
<b>Balão volumétrico 150 mL (5)</b>	659	298	361	340,6
<b>Balão volumétrico 150 mL (6)</b>	581	280	300	279,6
<b>Balão volumétrico 150 mL (7)</b>	616	293	322	301,6
<b>Balão volumétrico 150 mL (8)</b>	552	279	273	252,6

Tabela 4.8 - Ensaio 3 para o estudo dos pontos críticos com balões volumétricos de 150 ml

	TC (ppb)	IC (ppb)	TOC (ppb)	TOC final (ppb)
<b>Branco</b>	156	137	19,3	
<b>Balão volumétrico 150 mL (1)</b>	551	302	249	229,7
<b>Balão volumétrico 150 mL (2)</b>	527	286	241	221,7
<b>Balão volumétrico 150 mL (3)</b>	506	261	245	225,7
<b>Balão volumétrico 150 mL (4)</b>	576	274	302	282,7
<b>Balão volumétrico 150 mL (5)</b>	550	267	283	263,7
<b>Balão volumétrico 150 mL (6)</b>	527	271	256	236,7
<b>Balão volumétrico 150 mL (7)</b>	497	266	231	211,7
<b>Balão volumétrico 150 mL (8)</b>	789	429	360	340,7

Analisando as tabelas anteriores observa-se que os pontos da máquina que apresentam, repetidamente, os valores mais elevados de TOC se encontram nas posições 4 e 5.

Segue-se a localização exata dos pontos críticos da máquina Miele G 7835 CD:

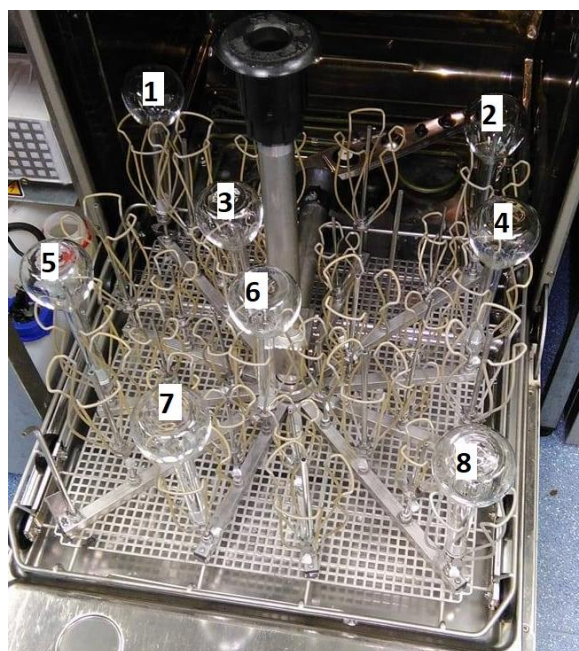


Figura 4.2 - Pontos analisados para a determinação dos pontos críticos da máquina G 7835 CD

✓ Pipetas graduadas de 25 mL

Tabela 4.9 - Ensaio 1 para o estudo dos pontos críticos com pipetas graduadas de 25 ml

	TC (ppb)	IC (ppb)	TOC (ppb)	TOC final (ppb)
<b>Branco</b>	258	172	85,7	
<b>Pipeta graduada 25 mL (1)</b>	689	251	438	352,3
<b>Pipeta graduada 25 mL (2)</b>	719	254	465	379,3
<b>Pipeta graduada 25 mL (3)</b>	688	271	417	331,3
<b>Pipeta graduada 25 mL (4)</b>	648	275	373	287,3
<b>Pipeta graduada 25 mL (5)</b>	673	369	304	218,3

Tabela 4.10 - Ensaio 2 para o estudo dos pontos críticos com pipetas graduadas de 25 ml

	TC (ppb)	IC (ppb)	TOC (ppb)	TOC final (ppb)
<b>Branco</b>	168	152	15,7	
<b>Pipeta graduada 25 mL (1)</b>	348	191	157	141,3
<b>Pipeta graduada 25 mL (2)</b>	468	216	252	236,3
<b>Pipeta graduada 25 mL (3)</b>	437	229	208	192,3
<b>Pipeta graduada 25 mL (4)</b>	443	206	238	222,3
<b>Pipeta graduada 25 mL (5)</b>	518	238	280	264,3

Tabela 4.11 - Ensaio 3 para o estudo dos pontos críticos com pipetas graduadas de 25 ml

	TC (ppb)	IC (ppb)	TOC (ppb)	TOC final (ppb)
<b>Branco</b>	156	140	16	
<b>Pipeta graduada 25 mL (1)</b>	256	169	86,7	70,7
<b>Pipeta graduada 25 mL (2)</b>	360	212	148	132
<b>Pipeta graduada 25 mL (3)</b>	409	245	164	148
<b>Pipeta graduada 25 mL (4)</b>	293	211	82	66
<b>Pipeta graduada 25 mL (5)</b>	290	209	80,7	64,7

Como se pode observar pela análise das tabelas anteriores, a posição onde o material apresenta repetidamente valores mais elevados de TOC é a posição 2 (Ponto crítico).

Segue-se a localização exata dos diversos pontos analisados da máquina Miele G 7835 CD:

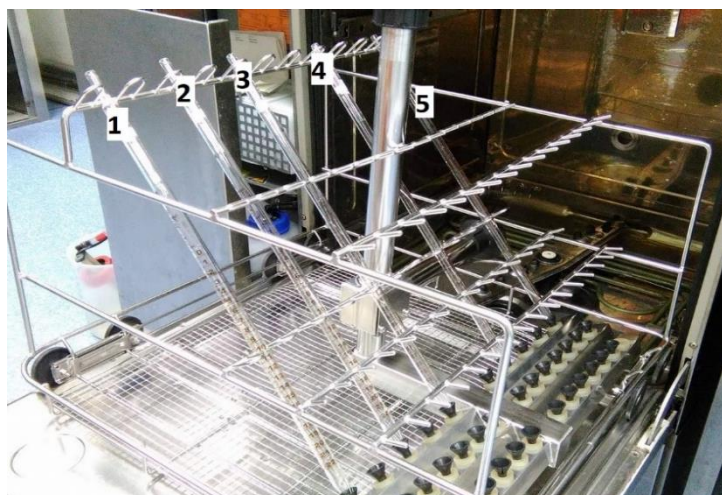


Figura 4.3 - Pontos analisados para a determinação dos pontos críticos da máquina G 7835 CD

b) Condutimetria

- Contaminação por Cloreto de Sódio

Tabela 4.12 - Valores de condutividade obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por cloreto de sódio (dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele G7835 CD

Material de laboratório	Condutividade do branco	Condutividade da amostra	Condutividade final* (< 3 $\mu$ S/cm)
Balão volumétrico 10,0 ml (1)	1,00	1,66	0,66
Balão volumétrico 10,0 ml (2)	1,12	1,42	0,30
Balão volumétrico 1000,0 ml (1)	1,05	1,98	0,93
Balão volumétrico 1000,0 ml (2)	1,07	1,38	0,31
Proveta 50,0 ml (1)	1,52	1,67	0,15
Proveta 50,0 ml (2)	1,48	1,98	0,50
Pipeta graduada 5,0 ml (1)	1,03	1,23	0,20
Pipeta graduada 5,0 ml (2)	1,04	1,28	0,24
Pipeta graduada 10,0 ml (1)	1,41	1,65	0,24
Pipeta graduada 10,0 ml (2)	0,99	1,11	0,12

\*O valor da condutividade final obtém-se através da subtração da condutividade do branco à condutividade da amostra

Tabela 4.12 - Valores de condutividade obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por cloreto de sódio (dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele G7835 CD (continuação)

Material de laboratório	Condutividade do branco	Condutividade da amostra		Condutividade final* (< 3 µS/cm)	
Pipeta diferencial 20,0 ml (1)	1,05	1,19		0,14	
Pipeta diferencial 20,0 ml (2)	1,10	1,14		0,04	
Pipeta diferencial 50,0 ml (1)	1,14	1,38		0,24	
Pipeta diferencial 50,0 ml (2)	1,08	1,87		0,79	
Copo polipropileno 50 ml (1)	0,83	3,30		2,47	
Copo polipropileno 50 ml (2)	0,89	1,59		0,70	
Copo polipropileno 250 ml (1)	0,96	1,16		0,20	
Copo polipropileno 250 ml (2)	1,01	1,13		0,12	
Tubos de ensaio 30 ml (10 unidades)	1,49	1: 1,59 2: 1,65 3: 1,73 4: 1,58 5: 1,88	6: 1,85 7: 2,20 8: 1,66 9: 1,80 10: 1,73	1: 0,10 2: 0,16 3: 0,24 4: 0,09 5: 0,39	6: 0,36 7: 0,71 8: 0,17 9: 0,31 10: 0,24
Espátula (1)	1,02	1,31		0,29	
Espátula (2)	0,90	1,36		0,46	
Pinça (1)	1,13	1,84		0,71	
Pinça (2)	1,23	2,13		0,90	

\*O valor da condutividade final obtém-se através da subtração da condutividade do branco à condutividade da amostra

Tabela 4.13 - Valores de condutividade obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por cloreto de sódio (dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele G7835 CD

Material de laboratório	Condutividade do branco	Condutividade da amostra		Condutividade final* (< 3 µS/cm)	
Balão volumétrico 10,0 ml (1)	0,92	1,08		0,16	
Balão volumétrico 10,0 ml (2)	0,89	1,13		0,24	
Balão volumétrico 1000,0 ml (1)	0,69	3,27		2,58	
Balão volumétrico 1000,0 ml (2)	0,69	1,20		0,51	
Proveta 50,0 ml (1)	0,82	1,24		0,42	
Proveta 50,0 ml (2)	0,69	0,91		0,22	
Pipeta graduada 5,0 ml (1)	1,16	1,50		0,34	
Pipeta graduada 5,0 ml (2)	1,00	1,66		0,66	
Pipeta graduada 10,0 ml (1)	0,93	1,13		0,20	
Pipeta graduada 10,0 ml (2)	0,83	1,17		0,34	
Pipeta diferencial 20,0 ml (1)	0,86	1,09		0,23	
Pipeta diferencial 20,0 ml (2)	0,76	0,87		0,11	
Pipeta diferencial 50,0 ml (1)	0,84	0,96		0,12	
Pipeta diferencial 50,0 ml (2)	0,77	0,90		0,13	
Copo polipropileno 50 ml (1)	0,79	1,00		0,21	
Copo polipropileno 50 ml (2)	0,76	1,40		0,64	
Copo polipropileno 250 ml (1)	0,78	1,38		0,60	
Copo polipropileno 250 ml (2)	0,73	0,90		0,17	
Tubos de ensaio 30 ml (10 unidades)	0,74	1: 0,81 2: 1,06 3: 0,84 4: 1,03 5: 0,89	6: 0,90 7: 0,95 8: 0,87 9: 0,90 10: 1,09	1: 0,07 2: 0,32 3: 0,10 4: 0,29 5: 0,15	6: 0,16 7: 0,21 8: 0,13 9: 0,16 10: 0,35
Espátula (1)	1,01	1,57		0,56	
Espátula (2)	0,82	1,13		0,31	
Pinça (1)	0,94	1,56		0,62	
Pinça (2)	0,95	1,84		0,89	

\*O valor da condutividade final obtém-se através da subtração da condutividade do branco à condutividade da amostra

Os valores de condutividade das águas de enxaguamento obtidas da contaminação do material com cloreto de sódio e posterior lavagem na máquina Miele G7835 CD estão todos dentro dos limites estabelecidos, ou seja, abaixo dos 3  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

No ensaio realizado no dia 1 um dos copos de polipropileno apresenta um valor de condutividade elevado (2,47  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) e no ensaio do dia 2 também se verificou um balão volumétrico de 1000 ml com uma condutividade elevada (2,58  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). Estes valores divergem um pouco dos outros valores, podendo essa divergência ser causada pela má colocação dos materiais nos respectivos suportes. Ainda assim, estes valores encontram-se abaixo do limite máximo.

Pode então concluir-se que o programa de lavagem da máquina Miele G 7835 CD é eficaz quando se trata da remoção de substâncias solúveis em água.

- Contaminação por Neodisher FLA

Tabela 4.14 - Valores de condutividade obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por neodisher FLA (dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele G7835 CD

Material de laboratório	Condutividade do branco	Condutividade da amostra		Condutividade final* (< 3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	
Balão volumétrico 10,0 ml (1)	0,92	1,13		0,21	
Balão volumétrico 10,0 ml (2)	0,87	1,15		0,28	
Balão volumétrico 1000,0 ml (1)	0,81	1,20		0,39	
Balão volumétrico 1000,0 ml (2)	0,76	1,22		0,46	
Proveta 50,0 ml (1)	1,05	1,09		0,04	
Proveta 50,0 ml (2)	0,86	1,09		0,24	
Pipeta graduada 5,0 ml (1)	0,88	1,19		0,31	
Pipeta graduada 5,0 ml (2)	0,95	1,36		0,41	
Pipeta graduada 10,0 ml (1)	0,82	1,12		0,30	
Pipeta graduada 10,0 ml (2)	0,92	1,24		0,32	
Pipeta diferencial 20,0 ml (1)	0,93	1,17		0,24	
Pipeta diferencial 20,0 ml (2)	0,99	1,04		0,05	
Pipeta diferencial 50,0 ml (1)	1,07	1,43		0,36	
Pipeta diferencial 50,0 ml (2)	1,11	1,20		0,09	
Copo polipropileno 50 ml (1)	0,84	1,35		0,51	
Copo polipropileno 50 ml (2)	0,75	1,05		0,30	
Copo polipropileno 250 ml (1)	0,84	1,00		0,16	
Copo polipropileno 250 ml (2)	0,79	1,10		0,31	
Tubos de ensaio 30 ml (10 unidades)	0,84	1: 1,08 2: 0,90 3: 0,95 4: 0,84 5: 0,84	6: 1,36 7: 0,87 8: 0,91 9: 0,93 10: 0,84	1: 0,24 2: 0,06 3: 0,11 4: 0,00 5: 0,00	6: 0,52 7: 0,03 8: 0,07 9: 0,09 10: 0,00
Espátula (1)	0,98	1,55		0,57	
Espátula (2)	0,90	1,24		0,34	
Pinça (1)	0,83	1,28		0,45	
Pinça (2)	0,82	1,81		0,99	

\*O valor da condutividade final obtém-se através da subtração da condutividade do branco à condutividade da amostra

Tabela 4.15 - Valores de condutividade obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por neodisher FLA (dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele G7835 CD

Material de laboratório	Condutividade do branco	Condutividade da amostra		Condutividade final* (< 3 µS/cm)	
Balão volumétrico 10,0 ml (1)	1,13	1,49		0,36	
Balão volumétrico 10,0 ml (2)	0,98	1,22		0,24	
Balão volumétrico 1000,0 ml (1)	0,93	1,57		0,64	
Balão volumétrico 1000,0 ml (2)	0,88	1,36		0,48	
Proveta 50,0 ml (1)	1,11	1,17		0,06	
Proveta 50,0 ml (2)	0,86	1,05		0,19	
Pipeta graduada 5,0 ml (1)	1,14	1,51		0,37	
Pipeta graduada 5,0 ml (2)	0,96	1,25		0,29	
Pipeta graduada 10,0 ml (1)	0,82	1,06		0,24	
Pipeta graduada 10,0 ml (2)	0,79	1,04		0,25	
Pipeta diferencial 20,0 ml (1)	0,84	2,73		1,89	
Pipeta diferencial 20,0 ml (2)	0,86	0,95		0,09	
Pipeta diferencial 50,0 ml (1)	0,87	2,65		1,78	
Pipeta diferencial 50,0 ml (2)	0,92	1,10		0,18	
Copo polipropileno 50 ml (1)	0,92	1,04		0,12	
Copo polipropileno 50 ml (2)	0,75	0,95		0,20	
Copo polipropileno 250 ml (1)	0,83	1,05		0,22	
Copo polipropileno 250 ml (2)	0,79	0,95		0,16	
Tubos de ensaio 30 ml (10 unidades)	0,83	1: 0,98 2: 0,83 3: 0,85 4: 0,89 5: 0,89	6: 1,11 7: 0,90 8: 0,84 9: 0,85 10: 0,84	1: 0,15 2: 0,00 3: 0,02 4: 0,06 5: 0,09	6: 0,28 7: 0,07 8: 0,01 9: 0,02 10: 0,01
Espátula (1)	0,86	1,37		0,51	
Espátula (2)	0,88	1,20		0,32	
Pinça (1)	0,94	1,37		0,43	
Pinça (2)	0,99	1,55		0,56	

\*O valor da condutividade final obtém-se através da subtração da condutividade do branco à condutividade da amostra

Através da análise das tabelas anteriores verifica-se que os valores de condutividade obtidos através do enxaguamento do material contaminado com detergente neodisher FLA estão todos abaixo do limite estabelecido, ou seja, o programa de lavagem da máquina Miele G 7835 CD é eficiente na remoção do detergente.

c) HPLC

- Contaminação por Sulfametoxazol

Tabela 4.16 - Teores em sulfametoxazol obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por sulfametoxazol (dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele G 7835 CD

Material de laboratório	Teor em Sulfametoxazol (µg/ml)		Critério de aceitação
Balão volumétrico 10,0 ml	< LD		≤ 1 µg/ml
Balão volumétrico 10,0 ml	< LD		
Balão volumétrico 1000,0 ml	< LD		
Balão volumétrico 1000,0 ml	< LD		
Proveta 50,0 ml	< LD.		
Proveta 50,0 ml	< LD		
Pipeta graduada 5,0 ml	< LD		
Pipeta graduada 5,0 ml	< LD		
Pipeta graduada 10,0 ml	< LD		
Pipeta graduada 10,0 ml	< LD		
Pipeta diferencial 20,0 ml	< LD		
Pipeta diferencial 20,0 ml	< LD		
Pipeta diferencial 50,0 ml	< LD		
Pipeta diferencial 50,0 ml	< LD		
Copo polipropileno 50 ml	< LD		
Copo polipropileno 50 ml	< LD		
Copo polipropileno 250 ml	< LD		
Copo polipropileno 250 ml	< LD		
Tubos de ensaio 30 ml (10 unidades)	1: < LD	6: < LD	
	2: < LD	7: < LD	
	3: < LD	8: < LD	
	4: < LD	9: < LD	
	5: < LD	10: < LD	
Espátula	< LD		
Espátula	< LD		
Pinça	< LD		
Pinça	< LD		

Tabela 4.17 - Teores em sulfametoxazol obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por sulfametoxazol (dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele G 7835 CD

Material de laboratório	Teor em Sulfametoxazol (µg/ml)	Critério de aceitação
Balão volumétrico 10,0 ml	< LD	≤ 1 µg/ml
Balão volumétrico 10,0 ml	< LD	
Balão volumétrico 1000,0 ml	< LD	
Balão volumétrico 1000,0 ml	< LD	
Proveta 50,0 ml	< LD	
Proveta 50,0 ml	< LD	
Pipeta graduada 5,0 ml	< LD	
Pipeta graduada 5,0 ml	< LD	
Pipeta graduada 10,0 ml	< LD	
Pipeta graduada 10,0 ml	< LD	
Pipeta diferencial 20,0 ml	< LD	
Pipeta diferencial 20,0 ml	< LD	
Pipeta diferencial 20,0 ml	< LD	
Pipeta diferencial 20,0 ml	< LD	
Pipeta diferencial 20,0 ml	< LD	

Tabela 4.17 - Teores em sulfametoxazol obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por sulfametoxazol (dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele G 7835 CD (continuação)

Material de laboratório	Teor em Sulfametoxazol (µg/ml)		Critério de aceitação
Pipeta diferencial 50,0 ml	< LD		≤ 1 µg/ml
Pipeta diferencial 50,0 ml	< LD		
Copo polipropileno 50 ml	< LD		
Copo polipropileno 50 ml	< LD		
Copo polipropileno 250 ml	< LD		
Copo polipropileno 250 ml	< LD		
Tubos de ensaio 30 ml (10 unidades)	1: < LD	6: < LD	
	2: < LD	7: < LD	
	3: < LD	8: < LD	
	4: < LD	9: < LD	
	5: < LD	10: < LD	
Espátula	< LD		
Espátula	< LD		
Pinça	< LD		
Pinça	< LD		

Nos dois ensaios, os teores em sulfametoxazol obtidos do enxaguamento do material contaminado são tão pequenos que nem são detetados e quantificados pelo método analítico, daí aparecer a denominação < LD (abreviatura de menor que o Limite de Detecção).

Dado que a quantidade de sulfametoxazol detetada no material se encontra em concentrações residuais então pode concluir-se que o programa de lavagem da máquina de lavar Miele G 7835 CD é eficaz na remoção de contaminantes insolúveis em água.

Os cromatogramas obtidos do enxaguamento do material, tanto para o ensaio do dia 1 como do dia 2, encontram-se em anexo (A1 – Figura A1.1 e A1.2).

#### 4.1.2 Miele PG 8583 CD

##### a) TOC

- Contaminação por Labwash

Começou-se por se efetuar o primeiro ensaio da contaminação do material por labwash e obteve-se os seguintes resultados:



Tabela 4.18 - Valores de TOC obtidos do enxaguamento do material contaminado com Labwash (Dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele PG 8583 CD

Material de laboratório	TOC experimental* (ppb C)	Critério de aceitação
Branco (Água purificada)	68,9	≤ 500 ppb (≤ 0,5 mg/l)
Balão volumétrico 10,0 ml (1)	176,1	
Balão volumétrico 10,0 ml (2)	285,1	
Balão volumétrico 1000,0 ml (1)	548,1	
Balão volumétrico 1000,0 ml (2)	432,1	
Proveta 50,0 ml (1)	224,1	
Proveta 50,0 ml (2)	278,1	
Pipeta graduada 5,0 ml (1)	250,1	
Pipeta graduada 5,0 ml (2)	929,1	
Pipeta graduada 10,0 ml (1)	1131,1	
Pipeta graduada 10,0 ml (2)	1001,1	

\*O valor da condutividade final obtém-se através da subtração da condutividade do branco à condutividade da amostra

A tabela completa com os valores de TC, IC e TOC encontra-se em anexo (A2 – Tabela A2.1).

Como se pode ver pela tabela anterior, existem valores de condutividade acima do limite estabelecido de 500 ppb, o que significa que existe alguma fonte de contaminação que impede que a lavagem elimine os resíduos existentes no material.

À semelhança do procedimento efetuado para chegar à origem da contaminação da máquina Miele G 7835 CD, foi feito o mesmo para a Miele PG 8583 CD, uma vez que as duas máquinas são semelhantes em termos de programas de lavagem.

Assim, começou-se por garantir que a contaminação da máquina Miele PG 8583 CD tinha origem na máquina em si. Como tal, foi efetuada uma lavagem do material em estudo, mas sem se proceder à sua contaminação. Os resultados obtidos encontram-se listados na tabela 4.19.

Tabela 4.19 - Valores TOC obtidos do enxaguamento de material por contaminar e submetido à lavagem na máquina Miele PG 8583 CD

Material de laboratório	TOC experimental* (ppb C)	Critério de aceitação
Branco (Água purificada)	30,2	≤ 500 ppb (≤ 0,5 mg/l)
Balão volumétrico 10,0 ml (1)	121,8	
Balão volumétrico 10,0 ml (2)	241,8	
Balão volumétrico 1000,0 ml (1)	510,8	
Balão volumétrico 1000,0 ml (2)	468,8	
Proveta 50,0 ml (1)	333,8	
Proveta 50,0 ml (2)	393,8	
Pipeta graduada 5,0 ml (1)	430,8	
Pipeta graduada 5,0 ml (2)	599,8	
Pipeta graduada 10,0 ml (1)	735,8	
Pipeta graduada 10,0 ml (2)	275,8	

\*O valor da condutividade final obtém-se através da subtração da condutividade do branco à condutividade da amostra

A tabela completa com os valores de TC, IC e TOC encontra-se em anexo (A2 – Tabela A2.2).

Analisando a tabela é notória a presença de material contaminado após a lavagem, garantindo assim que a contaminação provém da máquina de lavar. É então muito provável que a contaminação se deva a ação do neutralizante Neodisher Z, como tal foi efetuada a experiência da sua substituição por água purificada, sendo os resultados apresentados na tabela 4.20.

Tabela 4.20 - Valores de TOC obtidos do enxaguamento de material por contaminar e submetido à lavagem na máquina Miele PG 8583 CD (Máquina injeta apenas detergente e água purificada)

Material de laboratório	TOC experimental* (ppb C)	Critério de aceitação
Branco (Água purificada)	42,8	≤ 500 ppb (≤ 0,5 mg/l)
Balão volumétrico 10,0 ml (1)	119,2	
Balão volumétrico 10,0 ml (2)	136,2	
Balão volumétrico 1000,0 ml (1)	291,2	
Balão volumétrico 1000,0 ml (2)	361,2	
Proveta 50,0 ml (1)	53,5	
Proveta 50,0 ml (2)	24,4	
Pipeta graduada 5,0 ml (1)	76,2	
Pipeta graduada 5,0 ml (2)	74,2	
Pipeta graduada 10,0 ml (1)	76,2	
Pipeta graduada 10,0 ml (2)	75,2	

\*O valor da condutividade final obtém-se através da subtração da condutividade do branco à condutividade da amostra

A tabela completa com os valores de TC, IC e TOC encontra-se em anexo (A2 – Tabela A2.3).

Através da análise dos resultados presentes na tabela anterior concluiu-se que a contaminação tinha claramente origem no neutralizante. Assim, à semelhança do sucedido com a máquina G 7835 CD, na máquina PG 8583 CD este também foi substituído pela água purificada.

De seguida procedeu-se então à contaminação do material com a solução de Labwash, em dois dias consecutivos. Os resultados obtidos encontram-se nas tabelas 4.21 e 4.22.

Tabela 4.21 - Valores de TOC obtidos do enxaguamento de material contaminado com Labwash (Dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele PG 8583 CD

Material de laboratório	TOC experimental* (ppb C)	Critério de aceitação
Branco (Água purificada)	14,5	≤ 500 ppb (≤ 0,5 mg/l)
Balão volumétrico 10,0 ml (1)	80,3	
Balão volumétrico 10,0 ml (2)	92,5	
Balão volumétrico 1000,0 ml (1)	184,5	
Balão volumétrico 1000,0 ml (2)	136,5	
Proveta 50,0 ml (1)	99,5	
Proveta 50,0 ml (2)	102,5	
Pipeta graduada 5,0 ml (1)	98,5	
Pipeta graduada 5,0 ml (2)	118,5	
Pipeta graduada 10,0 ml (1)	112,5	
Pipeta graduada 10,0 ml (2)	96,5	

\*O valor da condutividade final obtém-se através da subtração da condutividade do branco à condutividade da amostra

Tabela 4.22 - Valores de TOC obtidos do enxaguamento de material contaminado com Labwash (Dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele PG 8583 CD

Material de laboratório	TOC experimental* (ppb C)	Critério de aceitação
Branco (Água purificada)	31	≤ 500 ppb (≤ 0,5 mg/l)
Balão volumétrico 10,0 ml (1)	81	
Balão volumétrico 10,0 ml (2)	84	
Balão volumétrico 1000,0 ml (1)	122	
Balão volumétrico 1000,0 ml (2)	118	
Proveta 50,0 ml (1)	67	
Proveta 50,0 ml (2)	68	
Pipeta graduada 5,0 ml (1)	126	
Pipeta graduada 5,0 ml (2)	119	
Pipeta graduada 10,0 ml (1)	117	
Pipeta graduada 10,0 ml (2)	121	

\*O valor da condutividade final obtém-se através da subtração da condutividade do branco à condutividade da amostra

As tabelas completas com os valores de TC, IC e TOC, para os dois dias de ensaios, encontram-se em anexo (A2 – Tabela A2.4 e A2.5).

Após a eliminação do neodisher Z do programa de lavagem da máquina Miele PG 8583 CD os valores de TOC obtidos do enxaguamento do material previamente contaminado com labwash encontram-se todos dentro das especificações estabelecidas. Assim pode concluir-se que o programa de lavagem da máquina é eficaz na remoção do detergente.

#### Pontos críticos:

De modo a estudar a máquina Miele PG 8583 CD da forma mais completa possível foi analisada a existência de pontos críticos. Como tal, foram utilizados dois tipos de materiais: balões volumétricos de 150 ml e pipetas volumétricas de 5 ml, uma vez que cada um deles é inserido num suporte diferente quando submetidos ao processo de lavagem.

Os resultados obtidos encontram-se nas tabelas seguintes (Tabela 4.23 - 4.28).

- ✓ Balões volumétricos de 150 ml:

Tabela 4.23 - Ensaio 1 para o estudo dos pontos críticos com balões volumétricos de 150 ml

	TC (ppb)	IC (ppb)	TOC (ppb)	TOC final (ppb)
<b>Branco</b>	170	149	20	
<b>Balão volumétrico 150 mL (1)</b>	512	293	219	199
<b>Balão volumétrico 150 mL (2)</b>	518	265	253	233
<b>Balão volumétrico 150 mL (3)</b>	536	293	243	223
<b>Balão volumétrico 150 mL (4)</b>	558	269	289	269
<b>Balão volumétrico 150 mL (5)</b>	574	290	284	264
<b>Balão volumétrico 150 mL (6)</b>	559	302	256	236
<b>Balão volumétrico 150 mL (7)</b>	555	283	272	252
<b>Balão volumétrico 150 mL (8)</b>	569	285	284	264

Tabela 4.24 - Ensaio 2 para o estudo dos pontos críticos com balões volumétricos de 150 ml

	TC (ppb)	IC (ppb)	TOC (ppb)	TOC final (ppb)
<b>Branco</b>	148	127	20,4	
<b>Balão volumétrico 150 mL (1)</b>	648	304	344	323,6
<b>Balão volumétrico 150 mL (2)</b>	597	278	318	297,6
<b>Balão volumétrico 150 mL (3)</b>	636	293	343	322,6
<b>Balão volumétrico 150 mL (4)</b>	635	280	355	334,6
<b>Balão volumétrico 150 mL (5)</b>	571	275	296	275,6
<b>Balão volumétrico 150 mL (6)</b>	591	275	316	295,6
<b>Balão volumétrico 150 mL (7)</b>	580	288	293	272,6
<b>Balão volumétrico 150 mL (8)</b>	582	269	313	292,6

Tabela 4.25 - Ensaio 3 para o estudo dos pontos críticos com balões volumétricos de 150 ml

	TC (ppb)	IC (ppb)	TOC (ppb)	TOC final (ppb)
<b>Branco</b>	156	137	19,3	
<b>Balão volumétrico 150 mL (1)</b>	556	276	280	260,7
<b>Balão volumétrico 150 mL (2)</b>	562	258	304	284,7
<b>Balão volumétrico 150 mL (3)</b>	574	273	302	282,7
<b>Balão volumétrico 150 mL (4)</b>	570	268	302	282,7
<b>Balão volumétrico 150 mL (5)</b>	602	276	326	306,7
<b>Balão volumétrico 150 mL (6)</b>	579	271	308	288,7
<b>Balão volumétrico 150 mL (7)</b>	572	270	302	282,7
<b>Balão volumétrico 150 mL (8)</b>	582	269	313	293,7

Analisando as tabelas anteriores observa-se que os pontos da máquina que apresentam, repetidamente, os valores mais elevados de TOC se encontram nas posições 4, 5 e 8.

Segue-se a localização exata dos pontos críticos da máquina Miele PG 8583 CD:



Figura 4.4 - Pontos analisados para a determinação dos pontos críticos da máquina PG 8583 CD

✓ Pipetas volumétricas de 5 ml:

Tabela 4.26 - Ensaio 1 para o estudo dos pontos críticos com pipetas volumétricas de 5 ml

	TC (ppb)	IC (ppb)	TOC (ppb)	TOC final (ppb)
<b>Branco</b>	184	160	24,1	
<b>Pipeta volumétrica 5 mL (1)</b>	428	247	181	156,9
<b>Pipeta volumétrica 5 mL (2)</b>	574	331	243	218,9
<b>Pipeta volumétrica 5 mL (3)</b>	520	249	270	245,9
<b>Pipeta volumétrica 5 mL (4)</b>	546	273	273	248,9
<b>Pipeta volumétrica 5 mL (5)</b>	637	260	378	353,9
<b>Pipeta volumétrica 5 mL (6)</b>	448	248	200	175,9

Tabela 4.27 - Ensaio 2 para o estudo dos pontos críticos com pipetas volumétricas de 5 ml

	TC (ppb)	IC (ppb)	TOC (ppb)	TOC final (ppb)
<b>Branco</b>	171	149	22	
<b>Pipeta volumétrica 5 mL (1)</b>	616	265	352	330
<b>Pipeta volumétrica 5 mL (2)</b>	727	302	425	403
<b>Pipeta volumétrica 5 mL (3)</b>	774	308	466	444
<b>Pipeta volumétrica 5 mL (4)</b>	714	294	420	398
<b>Pipeta volumétrica 5 mL (5)</b>	661	324	337	315
<b>Pipeta volumétrica 5 mL (6)</b>	600	322	278	256

Tabela 4.28 - Ensaio 3 para o estudo dos pontos críticos com pipetas volumétricas de 5 ml

	TC (ppb)	IC (ppb)	TOC (ppb)	TOC final (ppb)
<b>Branco</b>	171	157	14,5	
<b>Pipeta volumétrica 5 mL (1)</b>	613	229	384	369,5
<b>Pipeta volumétrica 5 mL (2)</b>	522	233	289	274,5
<b>Pipeta volumétrica 5 mL (3)</b>	522	282	240	225,5
<b>Pipeta volumétrica 5 mL (4)</b>	482	268	214	199,5
<b>Pipeta volumétrica 5 mL (5)</b>	453	254	199	184,5
<b>Pipeta volumétrica 5 mL (6)</b>	437	266	171	156,5

A partir da observação das tabelas anteriores conclui-se que os pontos da máquina que apresentam, repetidamente, os valores mais elevados de TOC se encontram nas posições 2, 3 e 4. A figura seguinte mostra a localização exata dos pontos críticos da máquina Miele PG 8583 CD:

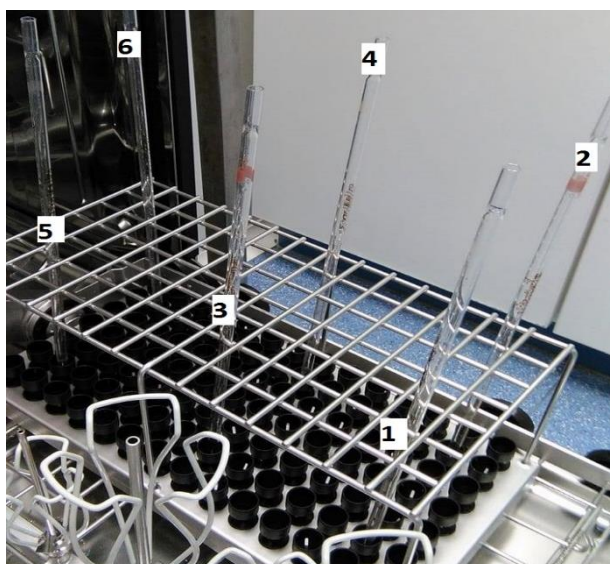


Figura 4.5 - Pontos analisados para a determinação dos pontos críticos da máquina PG 8583 CD

b) Condutimetria

- Contaminação por Cloreto de Sódio

Tabela 4.29 - Valores de condutividade obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por cloreto de sódio (dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele PG8583 CD

Material de laboratório	Condutividade do branco	Condutividade da amostra	Condutividade final* (< 3 $\mu$ S/cm)
Balão volumétrico 10 ml (1)	0,91	1,03	0,12
Balão volumétrico 10 ml (2)	1,01	1,02	0,01
Balão volumétrico 1000 ml (1)	0,92	1,18	0,26
Balão volumétrico 1000 ml (2)	0,73	1,11	0,38
Proveta 50 ml (1)	0,90	1,00	0,10
Proveta 50 ml (2)	0,89	1,00	0,11
Pipeta graduada 5 ml (1)	0,95	1,22	0,27
Pipeta graduada 5 ml (2)	0,76	1,16	0,40
Pipeta graduada 10 ml (1)	0,82	0,98	0,16
Pipeta graduada 10 ml (2)	0,89	0,99	0,10

\*O valor da condutividade final obtém-se através da subtração da condutividade do branco à condutividade da amostra

Tabela 4.30 - Valores de condutividade obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por cloreto de sódio (dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele PG8583 CD

Material de laboratório	Condutividade do branco	Condutividade da amostra	Condutividade final* (< 3 $\mu$ S/cm)
Balão volumétrico 10 ml (1)	0,71	0,81	0,10
Balão volumétrico 10 ml (2)	0,78	0,86	0,08
Balão volumétrico 1000 ml (1)	0,78	0,86	0,08
Balão volumétrico 1000 ml (2)	0,84	0,89	0,05
Proveta 50 ml (1)	0,77	1,02	0,25
Proveta 50 ml (2)	0,87	0,89	0,02
Pipeta graduada 5 ml (1)	0,68	0,98	0,30
Pipeta graduada 5 ml (2)	0,69	0,79	0,10
Pipeta graduada 10 ml (1)	0,75	0,75	0,00
Pipeta graduada 10 ml (2)	0,80	0,91	0,11

\*O valor da condutividade final obtém-se através da subtração da condutividade do branco à condutividade da amostra

Os valores de condutividade das águas de enxaguamento obtidas da contaminação do material com cloreto de sódio e posterior lavagem na máquina Miele PG 8583 CD estão todos dentro dos limites estabelecidos, ou seja, abaixo dos 3  $\mu$ S/cm. Assim, pode concluir-se que o programa de lavagem da máquina é eficiente na remoção de substâncias solúveis em água.

- Contaminação por Neodisher FLA

Tabela 4.31 - Valores de condutividade obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por neodisher FLA (dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele PG8583 CD

Material de laboratório	Condutividade do branco	Condutividade da amostra	Condutividade final* (< 3 $\mu$ S/cm)
Balão volumétrico 10 ml (1)	0,94	1,01	0,07
Balão volumétrico 10 ml (2)	1,36	1,09	0
Balão volumétrico 1000 ml (1)	0,90	1,22	0,32
Balão volumétrico 1000 ml (2)	0,92	1,05	0,13
Proveta 50 ml (1)	0,87	0,96	0,09
Proveta 50 ml (2)	0,99	0,98	0
Pipeta graduada 5 ml (1)	0,78	0,97	0,19
Pipeta graduada 5 ml (2)	0,79	1,00	0,21
Pipeta graduada 10 ml (1)	0,46	0,96	0,50
Pipeta graduada 10 ml (2)	0,78	1,56	0,78

\*O valor da condutividade final obtém-se através da subtração da condutividade do branco à condutividade da amostra

Tabela 4.32 - Valores de condutividade obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por neodisher FLA (dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele PG8583 CD

Material de laboratório	Condutividade do branco	Condutividade da amostra	Condutividade final* (< 3 $\mu$ S/cm)
Balão volumétrico 10 ml (1)	0,94	0,92	0
Balão volumétrico 10 ml (2)	0,92	0,99	0,07
Balão volumétrico 1000 ml (1)	0,91	1,27	0,36
Balão volumétrico 1000 ml (2)	0,99	1,19	0,20
Proveta 50 ml (1)	0,88	0,92	0,04
Proveta 50 ml (2)	0,96	1,00	0,04
Pipeta graduada 5 ml (1)	0,77	1,00	0,23
Pipeta graduada 5 ml (2)	0,92	1,02	0,10
Pipeta graduada 10 ml (1)	0,79	1,05	0,26
Pipeta graduada 10 ml (2)	0,76	1,44	0,68

\*O valor da condutividade final obtém-se através da subtração da condutividade do branco à condutividade da amostra

Relativamente à contaminação por neodisher FLA, os valores da condutividade obtidos do enxaguamento do material são no geral muito baixos, encontrando-se dentro dos limites estabelecidos. Existem até alguns materiais que apresentam valores de condutividade final de zero, garantindo a ausência de qualquer resíduo do detergente. Como tal, pode assumir-se que o programa de lavagem da máquina Miele PG 8583 CD é eficaz na remoção do detergente, deixando o material limpo.

c) HPLC

- Contaminação por Sulfametoxazol

Tabela 4.33 - Teores em sulfametoxazol obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por sulfametoxazol (Dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele PG 8583 CD

Material de laboratório	Teor em Sulfametoxazol (µg/ml)	Critério de aceitação
Balão volumétrico 10,0 ml (1)	< LD	≤ 1 µg/ml
Balão volumétrico 10,0 ml (2)	< LD	
Balão volumétrico 1000,0 ml (1)	< LD	
Balão volumétrico 1000,0 ml (2)	< LD	
Proveta 50,0 ml (1)	< LD	
Proveta 50,0 ml (2)	< LD	
Pipeta graduada 5,0 ml (1)	< LD	
Pipeta graduada 5,0 ml (2)	< LD	
Pipeta graduada 10,0 ml (1)	< LD	
Pipeta graduada 10,0 ml (2)	< LD	

Tabela 4.34 - Teores em sulfametoxazol obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por sulfametoxazol (Dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele PG 8583 CD

Material de laboratório	Teor em Sulfametoxazol (µg/ml)	Critério de aceitação
Balão volumétrico 10,0 ml (1)	< LD	≤ 1 µg/ml
Balão volumétrico 10,0 ml (2)	< LD	
Balão volumétrico 1000,0 ml (1)	< LD	
Balão volumétrico 1000,0 ml (2)	< LD	
Proveta 50,0 ml (1)	< LD	
Proveta 50,0 ml (2)	< LD	
Pipeta graduada 5,0 ml (1)	< LD	
Pipeta graduada 5,0 ml (2)	< LD	
Pipeta graduada 10,0 ml (1)	< LD	
Pipeta graduada 10,0 ml (2)	< LD	

Nos dois ensaios efetuados, os teores em sulfametoxazol obtidos do enxaguamento do material são tão mínimos que não são detetados nem quantificados pelo método analítico.

Uma vez que a quantidade de sulfametoxazol detetada no material se encontra em concentrações residuais pode então concluir-se que o programa de lavagem da máquina de lavar Miele PG 8583 CD é eficaz na remoção de substâncias insolúveis em água.

Os cromatogramas obtidos do enxaguamento do material, para os dois ensaios, encontram-se em anexo (A2 – Figura A2.1 e A2.2).

#### 4.1.3. Miele G7733

a) TOC

- Contaminação por Labwash

De modo a garantir que não existia qualquer tipo de contaminações na máquina Miele G 7733 foi efetuada uma lavagem do material em estudo sem este estar contaminado. O resultado encontra-se na tabela 4.35.



Tabela 4.35 - Valores TOC obtidos do enxaguamento de material por contaminar e submetido à lavagem na máquina Miele G7733

Material de laboratório	TOC experimental* (ppb C)		Critério de aceitação
Branco (Água purificada)	19,2		≤ 500 ppb (≤ 0,5 mg/l)
Copo polipropileno 100 ml (1)	167,8		
Copo polipropileno 100 ml (2)	167,8		
Copo polipropileno 250 ml (1)	132,8		
Copo polipropileno 250 ml (2)	95,8		
Copos de filtração 300 ml (1)	200,8		
Copos de filtração 300 ml (2)	262,8		
Almofariz e pilão (1)	241,8		
Almofariz e pilão (2)	268,8		
Frascos 100 ml (1)	67,8		
Frascos 100 ml (2)	50,8		
Frasco 1000 ml (1)	158,8		
Frasco 1000 ml (2)	186,8		
Frasco 2000 ml (1)	305,8		
Frasco 2000 ml (2)	493,8		
Espátula (1)	150,8		
Espátula (2)	149,8		
Pinça (1)	253,8		
Pinça (2)	210,8		
Tubos de ensaio 30 ml (10 unidades)	1: 195,8 2: 156,8 3: 171,8 4: 208,8 5: 193,8	6: 242,8 7: 172,8 8: 152,8 9: 176,8 10: 262,8	

\*O valor de TOC experimental resulta da subtração do valor TOC do branco ao valor TOC de cada material

Nesta tabela encontram-se apenas os valores de TOC finais, sendo que a tabela completa, com os valores de TC e IC para cada material, se encontra anexo (A1-Tabela A3.1).

Através da análise da tabela anterior verifica-se que todas as águas de enxaguamento do material se encontram com valores de TOC dentro do limite de aceitação, ou seja, abaixo dos 500 ppb. Como tal, assume-se que a máquina não é fonte de nenhum tipo de contaminação.

Procedeu-se então à contaminação do material com o detergente Labwash, em dois dias consecutivos:

Tabela 4.36 - Valores de TOC obtidos do enxaguamento de material contaminado com Labwash (Dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele G7733

Material de laboratório	TOC experimental* (ppb C)	Critério de aceitação
Branco (Água purificada)	29,3	≤ 500 ppb (≤ 0,5 mg/l)
Copo polipropileno 100 ml (1)	219,7	
Copo polipropileno 100 ml (2)	270,7	
Copo polipropileno 250 ml (1)	424,7	
Copo polipropileno 250 ml (2)	397,7	
Copos de filtração 300 ml (1)	305,7	
Copos de filtração 300 ml (2)	232,7	
Almofariz e pilão (1)	416,7	
Almofariz e pilão (2)	327,7	
Frascos 100 ml (1)	109,7	

\*O valor de TOC experimental resulta da subtração do valor TOC do branco ao valor TOC de cada material

Tabela 4.36 - Valores de TOC obtidos do enxaguamento de material contaminado com Labwash (Dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele G7733 (continuação)

Material de laboratório	TOC experimental* (ppb C)		Critério de aceitação
Frascos 100 ml (2)	100,7		≤ 500 ppb (≤ 0,5 mg/l)
Frasco 1000 ml (1)	261,7		
Frasco 1000 ml (2)	298,7		
Frasco 2000 ml (1)	399,7		
Frasco 2000 ml (2)	301,7		
Espátula (1)	111,7		
Espátula (2)	112,7		
Pinça (1)	166,7		
Pinça (2)	164,7		
Tubos de ensaio 30 ml (10 unidades)	1: 138,7 2: 164,7 3: 184,7 4: 298,7 5: 201,7	6: 208,7 7: 161,7 8: 153,7 9: 129,7 10: 155,7	

Tabela 4.37 - Valores de TOC obtidos do enxaguamento de material contaminado com Labwash (Dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele G7733

Material de laboratório	TOC experimental* (ppb C)		Critério de aceitação
Branco (Água purificada)	24,6		≤ 500 ppb (≤ 0,5 mg/l)
Copo polipropileno 100 ml (1)	63,0		
Copo polipropileno 100 ml (2)	76,4		
Copo polipropileno 250 ml (1)	225,4		
Copo polipropileno 250 ml (2)	205,4		
Copos de filtração 300 ml (1)	254,4		
Copos de filtração 300 ml (2)	237,4		
Almofariz e pilão (1)	205,4		
Almofariz e pilão (2)	220,4		
Frascos 100 ml (1)	109,4		
Frascos 100 ml (2)	72,7		
Frasco 1000 ml (1)	154,4		
Frasco 1000 ml (2)	164,4		
Frasco 2000 ml (1)	399,4		
Frasco 2000 ml (2)	291,4		
Espátula (1)	123,4		
Espátula (2)	128,4		
Pinça (1)	138,4		
Pinça (2)	151,4		
Tubos de ensaio 30 ml (10 unidades)	1: 149,4 2: 76,4 3: 87,4 4: 94,4 5: 70,7	6: 97,4 7: 145,4 8: 96,4 9: 117,4 10: 144,4	

\*O valor de TOC experimental resulta da subtração do valor TOC do branco ao valor TOC de cada material

As tabelas completas, onde se apresentam os valores de TC, IC e TOC de cada material encontram-se em anexo (A3-Tabelas A3.2 e A3.3).

Os valores de TOC obtidos do enxaguamento do material contaminado com labwash e submetido ao processo de lavagem na máquina Miele G7733 estão todos abaixo do valor de 500 ppb, ou seja, conformes. Assim, pode afirmar-se que o programa de lavagem da máquina G 7733 é eficaz na remoção do detergente labwash, deixando o material com resíduos em níveis aceitáveis.

#### Pontos críticos:

De forma a efetuar uma análise o mais completa possível da máquina Miele G7733 foi estudada a existência de pontos críticos. Como tal, foram utilizados dois tipos de materiais: frascos de 1000 ml e copos de polipropileno de 250 ml, uma vez que cada um destes é inserido num suporte diferente que se encontra a uma altura na máquina também diferente.

Os resultados obtidos encontram-se listados nas tabelas seguintes (Tabela 4.38 – 4.43).

✓ Material: Frascos de 1000 ml

Tabela 4.38 - Ensaio 1 para o estudo dos pontos críticos com frascos de 1000 ml

	TC (ppb)	IC (ppb)	TOC (ppb)	TOC final (ppb)
<b>Branco</b>	183	158	25,3	
<b>Frasco 1000 mL (1)</b>	706	289	417	391,7
<b>Frasco 1000 mL (2)</b>	506	301	204	178,7
<b>Frasco 1000 mL (3)</b>	514	295	218	192,7
<b>Frasco 1000 mL (4)</b>	494	305	189	163,7
<b>Frasco 1000 mL (5)</b>	548	308	240	214,7
<b>Frasco 1000 mL (6)</b>	473	286	187	161,7

Tabela 4.39 - Ensaio 2 para o estudo dos pontos críticos com frascos de 1000 ml

	TC (ppb)	IC (ppb)	TOC (ppb)	TOC final (ppb)
<b>Branco</b>	195	173	21,7	
<b>Frasco 1000 mL (1)</b>	723	319	404	382,3
<b>Frasco 1000 mL (2)</b>	495	311	184	162,3
<b>Frasco 1000 mL (3)</b>	527	325	202	180,3
<b>Frasco 1000 mL (4)</b>	560	321	240	218,3
<b>Frasco 1000 mL (5)</b>	551	342	209	187,3
<b>Frasco 1000 mL (6)</b>	7470	5130	2340	2318,3

Tabela 4.40 - Ensaio 3 para o estudo dos pontos críticos com frascos de 1000 ml

	TC (ppb)	IC (ppb)	TOC (ppb)	TOC final (ppb)
<b>Branco</b>	213	175	38,9	
<b>Frasco 1000 mL (1)</b>	743	342	401	362,1
<b>Frasco 1000 mL (2)</b>	591	327	264	225,1
<b>Frasco 1000 mL (3)</b>	592	348	245	206,1
<b>Frasco 1000 mL (4)</b>	642	315	327	288,1
<b>Frasco 1000 mL (5)</b>	711	376	335	296,1
<b>Frasco 1000 mL (6)</b>	8790	6190	2600	2561,1

Como se pode observar pela análise das tabelas anteriores, as posições que apresentam repetidamente maiores valores de TOC são os pontos 1 e 6. O ponto 6 é um local onde se deve evitar colocar material, uma vez que os resultados obtidos estão muito acima do limite aceitável.

Segue-se a localização exata dos pontos críticos da máquina Miele G 7733:



Figura 4.6 - Pontos analisados para a determinação dos pontos críticos da máquina G 7733

✓ Material: Copos de polipropileno de 250 ml

Tabela 4.41 - Ensaio 1 para o estudo dos pontos críticos com copos de polipropileno de 250 ml

	TC (ppb)	IC (ppb)	TOC (ppb)	TOC final (ppb)
<b>Branco</b>	32,1	187	219	
<b>Copo polipropileno 250 mL (1)</b>	731	308	423	204,0
<b>Copo polipropileno 250 mL (2)</b>	582	284	298	79,0
<b>Copo polipropileno 250 mL (3)</b>	653	289	365	146,0
<b>Copo polipropileno 250 mL (4)</b>	525	306	220	1,0
<b>Copo polipropileno 250 mL (5)</b>	710	330	381	162,0
<b>Copo polipropileno 250 mL (6)</b>	649	322	328	109,0

Tabela 4.42 - Ensaio 2 para o estudo dos pontos críticos com copos de polipropileno de 250 ml

	TC (ppb)	IC (ppb)	TOC (ppb)	TOC final (ppb)
<b>Branco</b>	247	206	41,9	
<b>Copo polipropileno 250 mL (1)</b>	775	303	472	430,1
<b>Copo polipropileno 250 mL (2)</b>	602	329	273	231,1
<b>Copo polipropileno 250 mL (3)</b>	556	348	208	166,1
<b>Copo polipropileno 250 mL (4)</b>	508	322	186	144,1
<b>Copo polipropileno 250 mL (5)</b>	683	354	329	287,1
<b>Copo polipropileno 250 mL (6)</b>	674	486	188	154,5

Tabela 4.43 - Ensaio 3 para o estudo dos pontos críticos com copos de polipropileno de 250 ml

	TC (ppb)	IC (ppb)	TOC (ppb)	TOC final (ppb)
<b>Branco</b>	145	126	18,4	
<b>Copo polipropileno 250 mL (1)</b>	327	214	113	94,6
<b>Copo polipropileno 250 mL (2)</b>	355	225	130	111,6
<b>Copo polipropileno 250 mL (3)</b>	380	253	127	108,6
<b>Copo polipropileno 250 mL (4)</b>	420	281	139	120,6
<b>Copo polipropileno 250 mL (5)</b>	438	287	151	132,6
<b>Copo polipropileno 250 mL (6)</b>	413	277	136	117,6

Analisando as tabelas anteriores conclui-se que os pontos críticos, quando utilizado o suporte superior da máquina, se encontram nas posições 1 e 5. Nestas posições, por norma, as águas de enxaguamento dos materiais submetidos à lavagem apresentam um valor mais elevado de TOC.

Os pontos críticos encontram-se detalhados na figura seguinte:



Figura 4.7 - Pontos analisados para a determinação dos pontos críticos da máquina G 7733

b) Condutimetria

- Contaminação por Cloreto de Sódio

Tabela 4.44 - Valores de condutividade obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por cloreto de sódio (dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele G7733

Material de laboratório	Condutividade do branco		Condutividade da amostra		Condutividade final* (< 3 µS/cm)	
Tubos de ensaio 30 ml (10 unidades)	1: 1,05	6: 0,91	1: 1,09	6: 1,05	1: 0,04	6: 0,14
	2: 0,89	7: 0,98	2: 1,06	7: 1,03	2: 0,17	7: 0,05
	3: 0,87	8: 0,92	3: 1,08	8: 1,00	3: 0,21	8: 0,08
	4: 0,87	9: 0,94	4: 1,13	9: 1,07	4: 0,26	9: 0,13
	5: 0,99	10: 1,17	5: 1,08	10: 1,20	5: 0,09	10: 0,03
Copo polipropileno 100 ml	0,93		1,17		0,24	
Copo polipropileno 100 ml	0,99		1,25		0,29	
Copo polipropileno 250 ml	1,02		1,25		0,23	
Copo polipropileno 250 ml	0,96		1,19		0,23	
Copos de filtração 300 ml	1,12		1,30		0,18	
Copos de filtração 300 ml	0,95		1,12		0,17	
Almofariz e pilão	0,93		1,83		0,90	
Almofariz e pilão	1,16		1,59		0,43	
Frasco 100 ml	0,87		1,43		0,56	
Frasco 100 ml	0,95		1,50		0,55	
Frasco 1000 ml	0,99		1,32		0,33	
Frasco 1000 ml	0,89		1,17		0,28	
Frasco 2000 ml	0,94		1,17		0,23	
Frasco 2000 ml	1,07		1,26		0,19	
Espátula	0,96		1,20		0,24	
Espátula	1,05		1,46		0,41	
Pinça	0,97		1,58		0,61	
Pinça	1,11		2,87		1,76	

\*O valor da condutividade final obtém-se através da subtração da condutividade do branco à condutividade da amostra

Tabela 4.45 - Valores de condutividade obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por cloreto de sódio (dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele G7733

Material de laboratório	Condutividade do branco		Condutividade da amostra		Condutividade final* (< 3 µS/cm)	
Tubos de ensaio 30 ml (10 unidades)	1: 0,91	6: 0,96	1: 1,11	6: 0,99	1: 0,20	6: 0,03
	2: 0,87	7: 0,85	2: 0,98	7: 1,01	2: 0,11	7: 0,16
	3: 1,00	8: 0,82	3: 1,18	8: 0,92	3: 0,18	8: 0,10
	4: 0,86	9: 0,82	4: 1,16	9: 0,95	4: 0,30	9: 0,13
	5: 1,08	10: 0,99	5: 1,57	10: 1,02	5: 0,49	10: 0,03
Copo polipropileno 100 ml	1,00		1,08		0,08	
Copo polipropileno 100 ml	1,20		1,15		0,05	
Copo polipropileno 250 ml	0,88		0,88		0,00	
Copo polipropileno 250 ml	0,88		0,96		0,08	
Copos de filtração 300 ml	0,84		1,38		0,54	
Copos de filtração 300 ml	0,87		1,38		0,51	
Almofariz e pilão	0,97		1,41		0,44	
Almofariz e pilão	0,93		1,72		0,79	
Frasco 100 ml	0,89		1,06		0,17	
Frasco 100 ml	0,91		1,20		0,29	
Frasco 1000 ml	0,90		1,13		0,23	
Frasco 1000 ml	0,88		1,22		0,34	
Frasco 2000 ml	1,01		1,27		0,26	
Frasco 2000 ml	0,86		1,15		0,29	
Espátula	0,93		1,48		0,55	
Espátula	0,88		1,39		0,51	
Pinça	0,87		1,85		0,98	
Pinça	0,94		1,79		0,85	

Os valores de condutividade das águas de enxaguamento que resultam da contaminação do material com cloreto de sódio encontram-se todos dentro das especificações estabelecidas, ou seja, abaixo dos 3  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , o que permite concluir que o programa de lavagem da máquina Miele G7733 é eficaz na remoção de substâncias solúveis em água.

- Contaminação por Neodisher FLA

Tabela 4.46 - Valores de condutividade obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por neodisher FLA (dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele G7733

Material de laboratório	Condutividade do branco		Condutividade da amostra		Condutividade final* (< 3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	
Tubos de ensaio 30 ml (10 unidades)	1: 0,93	6: 0,78	1: 1,16	6: 1,01	1: 0,23	6: 0,23
	2: 1,03	7: 0,82	2: 1,08	7: 0,97	2: 0,05	7: 0,15
	3: 0,94	8: 0,80	3: 1,14	8: 1,04	3: 0,20	8: 0,24
	4: 0,92	9: 0,87	4: 1,15	9: 1,12	4: 0,23	9: 0,25
	5: 0,80	10: 0,79	5: 0,98	10: 0,89	5: 0,18	10: 0,10
Copo polipropileno 100 ml	0,84		0,93		0,09	
Copo polipropileno 100 ml	0,88		1,03		0,15	
Copo polipropileno 250 ml	0,83		0,92		0,09	
Copo polipropileno 250 ml	0,84		0,89		0,05	
Copos de filtração 300 ml	0,91		1,55		0,64	
Copos de filtração 300 ml	1,04		1,62		0,58	
Almofariz e pilão	0,94		1,40		0,46	
Almofariz e pilão	0,89		1,44		0,55	
Frasco 100 ml	0,98		1,30		0,32	
Frasco 100 ml	1,14		1,30		0,16	
Frasco 1000 ml	0,94		1,20		0,26	
Frasco 1000 ml	0,99		1,44		0,45	
Frasco 2000 ml	0,80		1,13		0,33	
Frasco 2000 ml	0,88		1,34		0,46	
Espátula	0,94		1,16		0,22	
Espátula	1,04		1,51		0,47	
Pinça	1,07		2,29		1,22	
Pinça	1,32		2,67		1,35	

\*O valor da condutividade final obtém-se através da subtração da condutividade do branco à condutividade da amostra

Tabela 4.47 - Valores de condutividade obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por neodisher FLA (dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele G7733

Material de laboratório	Condutividade do branco		Condutividade da amostra		Condutividade final* (< 3 $\mu$ S/cm)	
Tubos de ensaio 30 ml (10 unidades)	1: 1,45 2: 0,61 3: 0,56 4: 0,61 5: 0,67	6: 0,58 7: 0,58 8: 0,62 9: 0,54 10: 0,54	1: 1,83 2: 0,74 3: 0,77 4: 0,98 5: 0,85	6: 0,68 7: 0,75 8: 0,86 9: 0,74 10: 0,70	1: 0,38 2: 0,13 3: 0,21 4: 0,37 5: 0,18	6: 0,10 7: 0,17 8: 0,24 9: 0,20 10: 0,16
Copo polipropileno 100 ml	0,63		0,69		0,06	
Copo polipropileno 100 ml	0,54		0,65		0,11	
Copo polipropileno 250 ml	0,68		0,75		0,07	
Copo polipropileno 250 ml	0,58		1,07		0,49	
Copos de filtração 300 ml	0,54		1,36		0,82	
Copos de filtração 300 ml	0,61		1,03		0,42	
Almofariz e pilão	0,57		1,08		0,51	
Almofariz e pilão	0,55		0,88		0,33	
Frasco 100 ml	0,53		0,75		0,22	
Frasco 100 ml	0,61		0,84		0,23	
Frasco 1000 ml	0,56		0,82		0,26	
Frasco 1000 ml	0,57		0,73		0,16	
Frasco 2000 ml	0,56		0,81		0,25	
Frasco 2000 ml	0,58		0,81		0,23	
Espátula	0,73		1,09		0,36	
Espátula	0,65		1,20		0,55	
Pinça	0,73		2,04		1,31	
Pinça	0,82		1,71		0,89	

\*O valor da condutividade final obtém-se através da subtração da condutividade do branco à condutividade da amostra

Através da análise das tabelas 4.46 e 4.47 verifica-se que os valores de condutividade obtidos através do enxaguamento do material contaminado com detergente neodisher FLA estão todos abaixo do limite estabelecido.

Observa-se também que as pinças são o tipo de material que apresenta valores mais elevados de condutividade, tanto para o ensaio realizado no dia 1 como no dia 2. Tal deve-se ao facto de estas serem constituídas por duas lâminas que encaixam uma na outra e, quando submetidas ao processo de lavagem, a água não consegue atingir toda a superfície do material.

Tendo em conta os resultados obtidos pode concluir-se que o programa de lavagem da máquina Miele G 7733 é eficiente na remoção do detergente neodisher FLA.



c) HPLC

- Contaminação por Sulfametoxazol

Tabela 4.48 - Teores em sulfametoxazol obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por sulfametoxazol (dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele G7733

Material de laboratório	Teor em Sulfametoxazol (µg/ml)		Critério de aceitação
Branco (Água purificada)	< LD		≤ 1 µg/ml
Copo polipropileno 100 ml (1)	< LD		
Copo polipropileno 100 ml (2)	< LD		
Copo polipropileno 250 ml (1)	< LD		
Copo polipropileno 250 ml (2)	< LD		
Copos de filtração 300 ml (1)	< LD		
Copos de filtração 300 ml (2)	< LD		
Almofariz e pilão (1)	< LD		
Almofariz e pilão (2)	< LD		
Frasco 100 ml (1)	< LD		
Frasco 100 ml (2)	< LD		
Frasco 1000 ml (1)	< LD		
Frasco 1000 ml (2)	< LD		
Frasco 2000 ml (1)	< LD		
Frasco 2000 ml (2)	< LD		
Espátula (1)	< LD		
Espátula (2)	< LD		
Pinça (1)	< LD		
Pinça (2)	< LD		
Tubos de ensaio 30 ml (10 unidades)	1: < LD 2: < LD 3: 1,1 4: < LD 5: < LD	6: < LD 7: < LD 8: < LD 9: < LD 10: < LD	

Neste primeiro ensaio, os teores em sulfametoxazol obtidos do enxaguamento do material contaminado são tão ínfimos que, na maioria do material, estes não são detetados e quantificados pelo método analítico, daí aparecer a denominação < LD.

Existe apenas um tubo de ensaio (T3) em que o teor em sulfametoxazol tem o valor de 1,1 µg/ml, como se pode observar pela tabela 4.49, valor esse que se encontra no limite máximo de aceitação.

Tabela 4.49 - Quantificação do teor em sulfametoxazol obtido da água de enxaguamento do tubo de ensaio 3

	Vial	Inj	Sample Name	Name	Sample Type	Retention Time (min)	Area (µV*sec)	Dilution	Amount	Sample Weight	Int Type
1	7	1	T3_1	Sulfametoxazol	Unknown	6.576	306535	1	1.070	1	BB
2	7	2	T3_1	Sulfametoxazol	Unknown	6.576	306223	1	1.069	1	BB
Mean									1.1		
%RSD									0.072		

O método analítico utilizado neste caso para a determinação do sulfametoxazol requer que se efetue duas injeções de cada vial, sendo o teor final de sulfametoxazol correspondente à média dessas duas injeções.

De seguida são apresentados os cromatogramas obtidos das duas injeções efetuadas ao vial composto pela água de enxaguamento do T3:

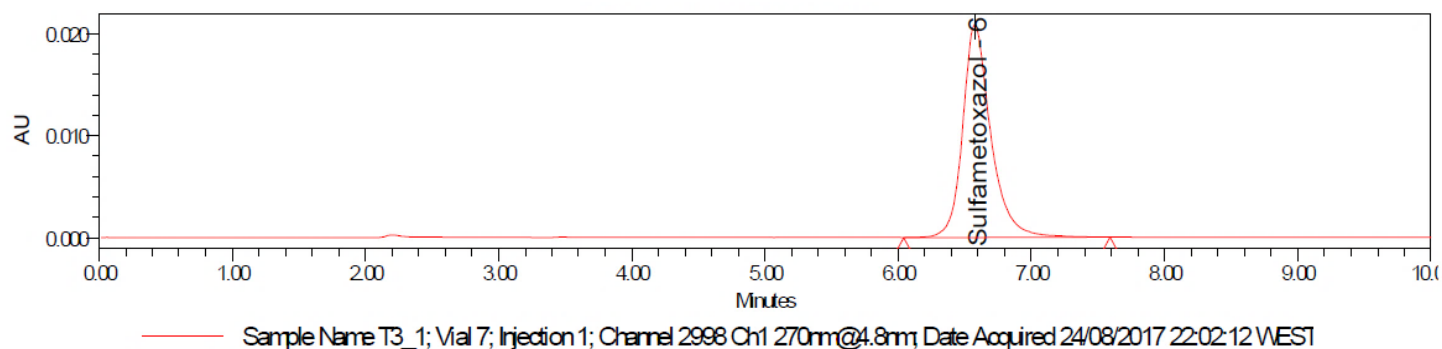


Figura 4.8 - Cromatograma obtido na primeira injeção do vial composto pela água de enxaguamento do T3

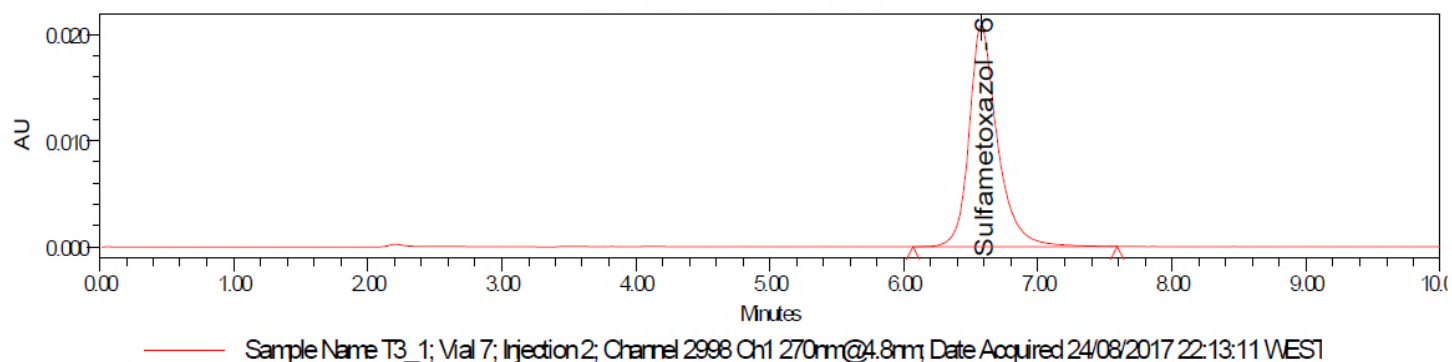


Figura 4.9 - Cromatograma obtido na segunda injeção do vial composto pela água de enxaguamento do T3

Os cromatogramas correspondentes aos outros materiais ensaiados na contaminação por sulfametoxazol (Dia 1) encontram-se em anexo (A3 – Figura A3.1).

Tabela 4.50 - Teores em sulfametoxazol obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por sulfametoxazol (dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele G7733

Material de laboratório	Teor em Sulfametoxazol (µg/ml)	Critério de aceitação
Branco (Água purificada)	< LD	≤ 1 µg/ml
Copo polipropileno 100 ml (1)	< LD	
Copo polipropileno 100 ml (2)	< LD	
Copo polipropileno 250 ml (1)	< LD	
Copo polipropileno 250 ml (2)	< LD	
Copos de filtração 300 ml (1)	< LD	
Copos de filtração 300 ml (2)	0,113	
Almofariz e pilão (1)	< LD	
Almofariz e pilão (2)	< LD	
Frasco 100 ml (1)	< LD	
Frasco 100 ml (2)	< LD	
Frasco 1000 ml (1)	< LD	
Frasco 1000 ml (2)	< LD	

Tabela 4.50 - Teores em sulfametoxazol obtidos do enxaguamento do material resultante da contaminação por sulfametoxazol (dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele G7733 (continuação)

Material de laboratório	Teor em Sulfametoxazol (µg/ml)		Critério de aceitação
Frasco 2000 ml (1)	< LD		≤ 1 µg/ml
Frasco 2000 ml (2)	< LD		
Espátula (1)	< LD		
Espátula (2)	< LD		
Pinça (1)	< LD		
Pinça (2)	< LD		
Tubos de ensaio 30 ml (10 unidades)	1: < LD	6: < LD	
	2: < LD	7: < LD	
	3: < LD	8: < LD	
	4: < LD	9: < LD	
	5: < LD	10: < LD	

No segundo ensaio, os teores em sulfametoxazol obtidos do enxaguamento do material contaminado são também tão pequenos que, na maioria do material, estes não são detetados e quantificados pelo método analítico.

Existe apenas um copo de filtração de 300 ml em que o teor em sulfametoxazol tem o valor de 0,113 µg/ml, como se pode observar pela tabela seguinte.

Tabela 4.51 - Quantificação do teor em sulfametoxazol obtido da água de enxaguamento do copo de filtração(2)

	Vial	Inj	Sample Name	Name	Sample Type	Retention Time (min)	Area (µV*sec)	Dilution	Amount	Sample Weight	Int Type
1	48	1	Copofiltracao(2)_2	Sulfametoxazol	Unknown	6.548	32862	1	0.113	1	BB
2	48	2	Copofiltracao(2)_2	Sulfametoxazol	Unknown	6.564	32854	1	0.113	1	BB
Mean									0.1		
%RSD									0.018		

O teor em sulfametoxazol apresentado na tabela anterior corresponde à média das duas injeções. De seguida são apresentados os cromatogramas obtidos das duas injeções efetuadas ao vial composto pela água de enxaguamento do copo de filtração (2):

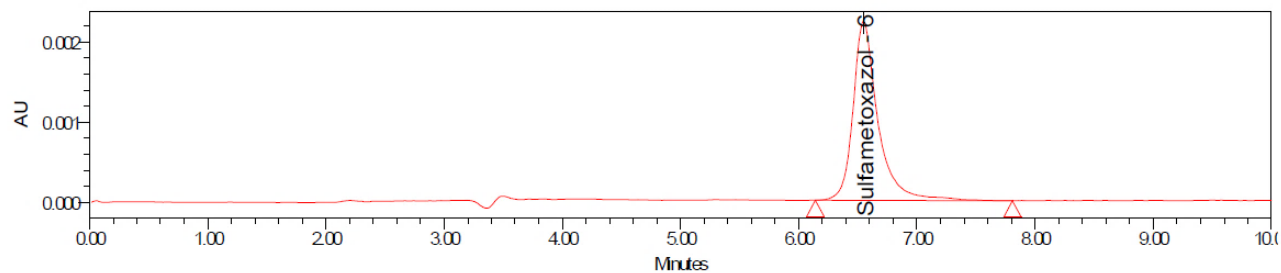


Figura 4.10 - Cromatograma obtido na primeira injeção do vial composto pela água de enxaguamento do copo de filtração (2)

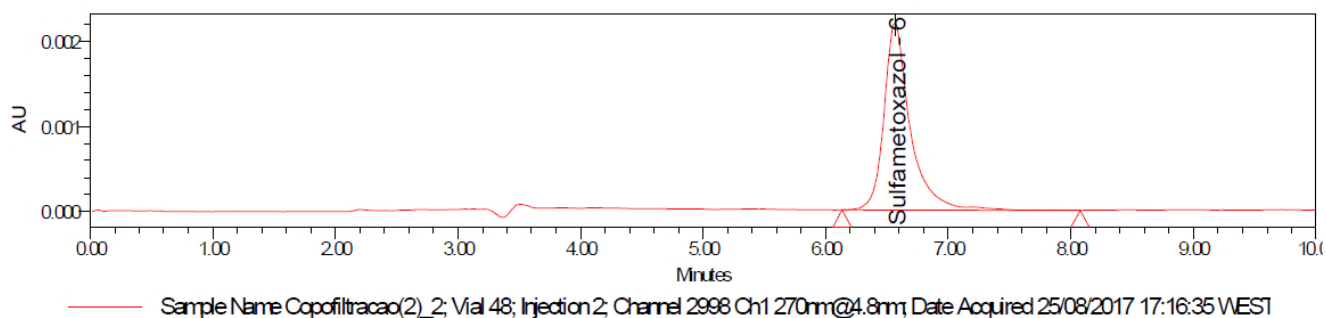


Figura 4.11 - Cromatograma obtido na segunda injeção do vial composto pela água de enxaguamento do copo de filtração (2)

Os cromatogramas correspondentes aos outros materiais ensaiados na contaminação por sulfametoxazol (Dia 2) encontram-se em anexo (A3 – Figura 3.2).

A partir dos resultados obtidos nos dois dias de contaminação por sulfametoxazol, pode concluir-se que o programa de lavagem da máquina Miele G 7733 é eficaz na remoção de contaminantes insolúveis em água.

## 4.2 Validação do método analítico por HPLC – Sulfametoxazol

Nesta secção serão apresentados os resultados obtidos nos diferentes ensaios da validação do método analítico.

Os critérios de aceitação respeitantes a cada ensaio encontram-se detalhados no capítulo 2 (2.4.3.1 Parâmetros da validação de métodos analíticos).

- **Seletividade**

Como já foi descrito anteriormente, para o ensaio da seletividade foram preparadas: uma solução de Neodisher FLA, uma solução de Labwash, uma solução padrão e uma solução placebo reforçada.

Procedeu-se à injeção de uma fase móvel e das soluções referidas no sistema cromatográfico, sendo apresentado de seguida os cromatogramas obtidos para cada uma delas.

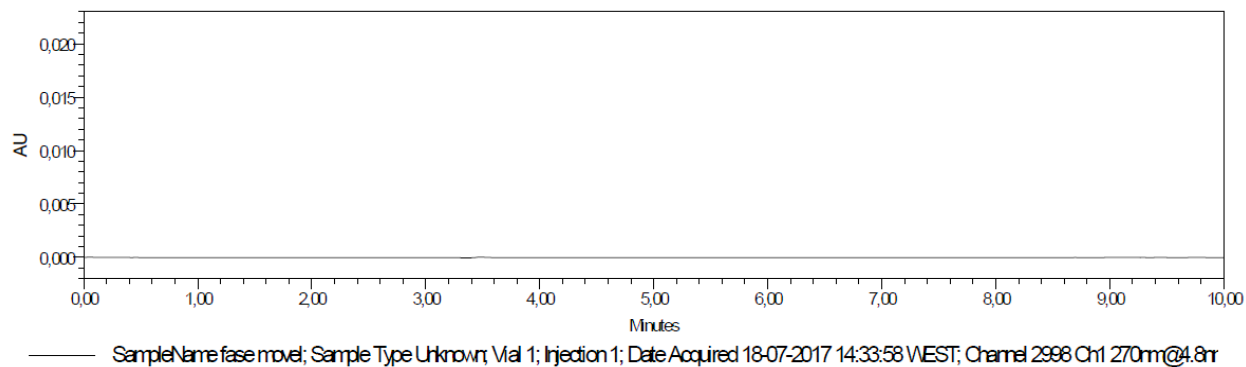


Figura 4.12 - Cromatograma obtido da primeira injeção da fase móvel

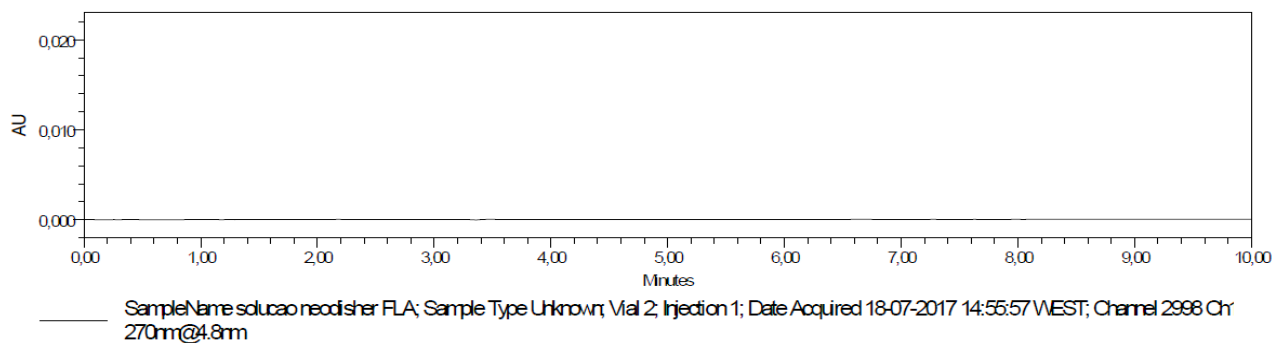


Figura 4.13 - Cromatograma obtido da primeira injeção da solução de Neodisher FLA

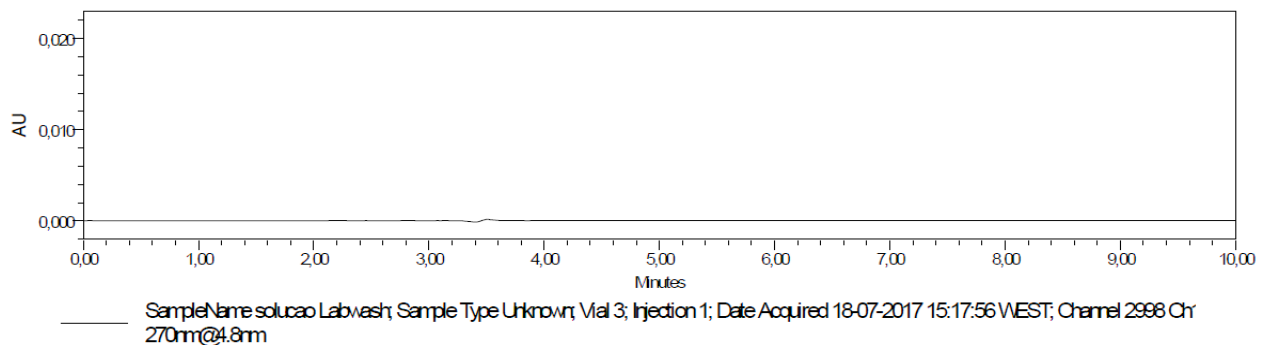


Figura 4.14 - Cromatograma obtido da primeira injeção da solução de Labwash

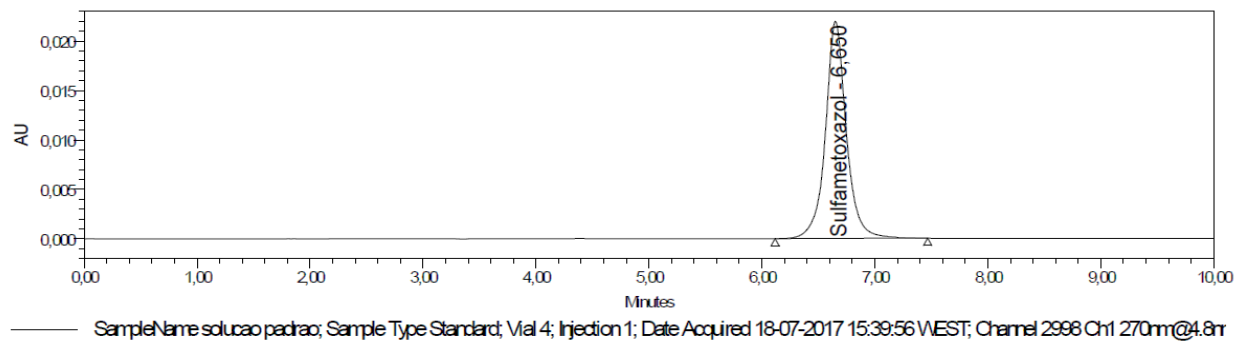


Figura 4.15 - Cromatograma obtido da primeira injeção da solução padrão

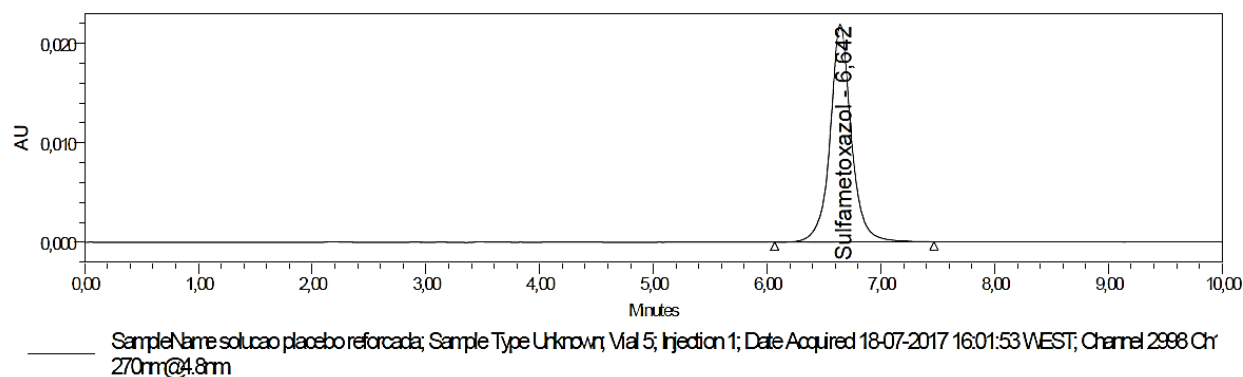


Figura 4.16 - Cromatograma obtido da primeira injeção da solução placebo reforçada

Analisando os cromatogramas obtidos constata-se que não existe qualquer interferência por parte das soluções de Labwash e Neodisher FLA no tempo de retenção do sulfametoxazol, uma vez que estas não apresentam nenhum pico detetado pelo sistema cromatográfico.

O ensaio da seletividade cumpre com os critérios de aceitação na medida em que apenas é detetado o pico de sulfametoxazol, quer na solução padrão, quer na solução placebo. Como tal, o método é seletivo para o sulfametoxazol.

- **Linearidade**

A linearidade do método foi avaliada através da construção de uma curva de calibração, deste modo prepararam-se cinco padrões abrangendo as concentrações entre 50 e 150%.

O gráfico e a equação da reta obtidos são os seguintes:

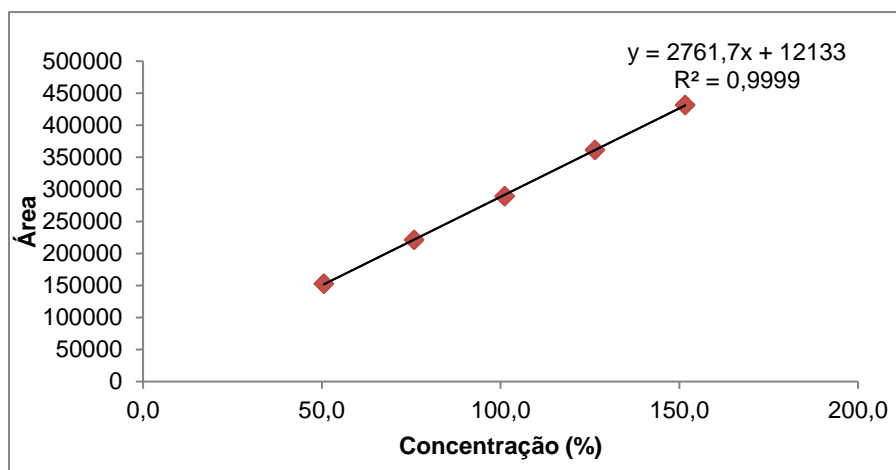


Figura 4.17 - Curva de calibração obtida no estudo da linearidade

**Coeficiente de correlação (r):**

	r encontrado	Critério	
Coeficiente de correlação	0,99993	>0,999	<b>Conforme</b>

**ANÁLISE DA VARIÂNCIA****Homogeneidade das variâncias (teste de Cochran)**

$$G_{exp} = 0,2000$$

$$G_{tab}(0,05;5;2) = 0,6838$$

Homogeneidade das variâncias das concentrações	$G_{exp} < G_{tab}$	<b>Variância das concentrações homogênea</b>
--	---------------------	--

**NORMALIDADE DOS RESIDUAIS (ANOVA)**

	SQ	graus de liberdade	Variância ( $V=S^2$ )	F exp
Regressão	97465371149	1	9,7465E+10	60693,767
Residual	12846837,7	8	1,6059E+06	
Falta de ajuste	3211709,425	3	1,0706E+06	0,556
Erro experimental	9635128,275	5	1,9270E+06	
Total	97478217987	9	1,0831E+10	

$$F1_{tab}(0,05;1;8) = 5,318$$

$$F2_{tab}(0,05;3;5) = 5,409$$

**Resultados****Critério**

F1 = Existência de um declive diferente de 0	$F1_{exp} > F1_{tab}$	<b>Existe declive diferente de zero Resultados lineares</b>
F2 = Linearidade entre os resultados obtidos	$F2_{exp} < F2_{tab}$	

**Coeficiente de variação do fator de resposta**

Soluções	Critério	CV (%)
Padrão 50	<b><math>\leq 2\%</math></b>	0,16
Padrão 75		0,07
Padrão 100		0,39
Padrão 125		0,16
Padrão 150		0,07
<b>Média</b>		<b>0,17</b>

**TESTE DE LINEARIDADE (t student)**

$$Sb^2(y,x) = 1,6059E+06$$

$$S^2 = 6,9813E+01$$

$$Sb = 8,355409812$$

$$t_{exp} = b/Sb = 3,305E+02$$

	t exp residual	t tab	Critério	
Inclinação da reta	330,53	1,860	t exp > t tab	<b>Declive diferente de zero</b>

**intervalos de confiança**

$$t = 2,306$$

$$\text{superior } (b+t \cdot Sb) = 2780,964737$$

$$\text{inferior } (b-t \cdot Sb) = 2742,429586$$

(19273,89774, 19107,51452) -> Este intervalo não inclui o zero => Conforme

**TESTE DE PROPORCIONALIDADE (t student)**

$$Sb^2(y,x) = 1605854,7125$$

$$Sa^2 = 1573737,6183$$

$$Sa = 1254,486994$$

$$t_{exp} = a/Sb = 9,8731$$

	t exp na origem	t tab		
Interseção com o ponto (0,0)	9,8731	1,860	t exp < t tab	<b>Não inclui o zero</b>

**intervalos de confiança**

$$t = 2,306$$

$$\text{superior } (a+t \cdot Sa) = 15278,54326$$

$$\text{inferior } (a-t \cdot Sa) = 9492,849248$$

(20311,61977, 2391,517036) -> Este intervalo não inclui o zero => Curva de calibração com pelo menos 2 pontos

Analisando os resultados obtidos neste estudo, pode concluir-se que o ensaio cumpre com os critérios de aceitação, na medida em que:

- O coeficiente de correlação calculado na regressão é superior a 0,999, indicando um elevado grau de relação entre as concentrações e as respetivas áreas;
- Verifica-se a homogeneidade da variância das concentrações ( $G_{exp} < G_{tab}$ ), ou seja, o fator de concentração não influencia a variabilidade dos dados;



- A regressão apresenta um declive diferente de zero e os resultados obtidos são lineares, ou seja, o método é linear;
- O coeficiente de variação dos fatores de resposta é inferior a 2%, indicando uma boa linearidade da calibração;
- O intervalo de confiança estudado no teste de proporcionalidade não inclui o zero, o que implica a realização de uma curva de calibração com pelo menos 2 pontos.

- **Gama de concentrações**

A gama de concentrações foi avaliada através dos dados obtidos nos estudos de linearidade e exatidão para as concentrações de 50, 100 e 150% e de acordo com a concentração teórica da solução amostra.

Tabela 4.52 - Resultados obtidos no estudo da gama de concentrações

**ÁREAS NO PADRÃO**

Linearidade

Teor (%)	Concentração (sulfametoxazol)	média área sulfametoxazol	RSD (%)
50	0,05	140535	0,06
100	0,10	276964	0,10
150	0,15	419372	0,05

**ÁREAS NA AMOSTRA**

Exatidão

Teor (%)	Concentração (sulfametoxazol)	média área sulfametoxazol	RSD (%)
50	0,05	139614	0,04
100	0,10	282017	0,09
150	0,15	421295	0,03

Teor (%)	RSD áreas
50	0,46
100	1,28
150	0,32

O RSD entre as áreas obtidas para a linearidade e exatidão encontra-se abaixo de 3%, cumprindo assim com o critério de aceitação.

- **Limite de deteção e quantificação (LD) e (LQ)**

Para o cálculo dos limites de deteção e quantificação foi criada uma reta de calibração com três níveis de concentração (0,5, 1 e 1,5% em sulfametoxazol).

Estas soluções de diferentes concentrações foram injetadas no sistema cromatográfico, sendo os resultados obtidos e a respetiva reta de calibração apresentados de seguida.

Tabela 4.53 - Sinal-ruído e áreas obtidos das três injeções de cada solução

0,50% Sulfametoxazol			1,00% Sulfametoxazol			1,50% Sulfametoxazol		
	Área	S/N		Área	S/N		Área	S/N
1ª inj	1316	11,6	1ª inj	2637	24	1ª inj	7343	66,2
2ª inj	1386	11,6	2ª inj	2662	23,8	2ª inj	7207	65,8
3ª inj	1344	11,8	3ª inj	2693	23,8	3ª inj	7204	66,8
Média	1348,67		Média	2664,00		Média	7251,33	
% RSD	2,61		% RSD	1,05		% RSD	1,09	

Tabela 4.54 - Áreas obtidas das injeções das soluções a 0.5, 1 e 1,5%

Concentração (%)	Concentração (ppm)	Área			Média da área	Desvio padrão
0,5	5000	1316	1386	1344	1348,67	2,61
1	10000	2637	2662	2693	2664,00	1,05
1,5	15000	7343	7207	7204	7251,33	1,09

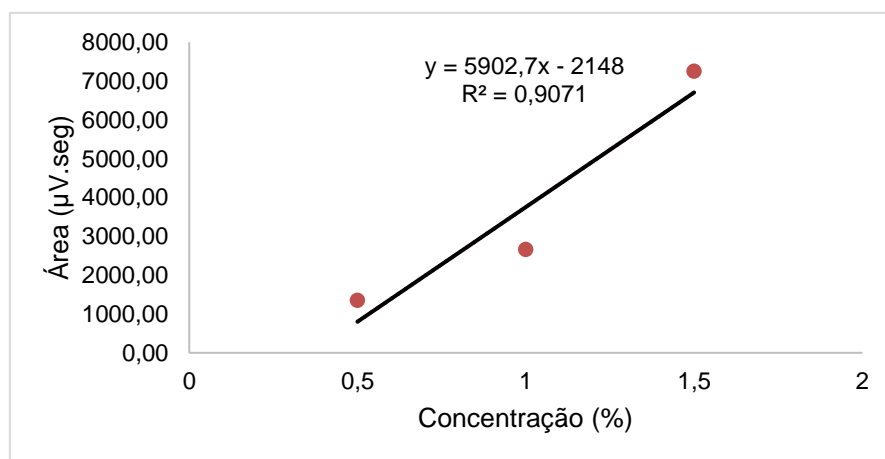


Figura 4.18 - Reta de calibração obtida

A reta de calibração obteve-se representando graficamente as áreas em função das concentrações. De seguida representou-se também o desvio padrão das áreas em função das concentrações estudadas, apresentado na figura 4.19.

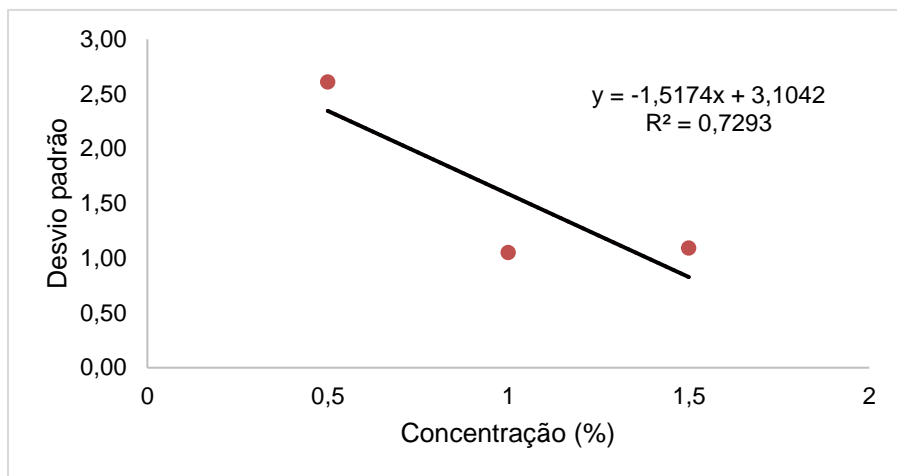


Figura 4.19 - Representação gráfica do desvio padrão em função da concentração

Após reunir todos os dados necessários, é então possível calcular os limites de detecção e quantificação a partir da equação 2.5. Como tal, foram assumidos os seguintes valores:

Tabela 4.55 - Valores utilizados para o cálculo dos limites de detecção e quantificação

<b>Y<sub>bl</sub></b>	2148
<b>K*</b>	3 / 10
<b>s<sub>bl</sub></b>	3,10
<b>b</b>	5902,70
<b>n</b>	3

\*O valor de K é 3 para o limite de detecção e 10 para o limite de quantificação

Tendo em conta a tabela anterior calculou-se os dois limites:

Tabela 4.56 - Limites de detecção e quantificação

<b>Limite de detecção</b>	0,211%
<b>Limite de quantificação</b>	0,213%

Analisando os resultados obtidos observa-se que as concentrações estudadas (0.5%, 1% e 1.5%) apresentam um sinal-ruído do pico de sulfametoxazol superior a 3 e o RSD das áreas inferior a 15%, estando em conformidade com os critérios de aceitação.

Através da análise destas concentrações conclui-se que o limite de detecção é 0,211% e o limite de quantificação é 0,213%.

- **Exatidão**

A exatidão foi avaliada através da taxa de recuperação do sulfametoxazol padrão. Deste modo, procedeu-se à preparação de soluções placebo carregadas com sulfametoxazol, apresentando

concentrações de 50, 100 e 150%. Posteriormente, os valores obtidos foram comparados com soluções padrão de sulfametoxazol na mesma gama de concentrações. Os resultados encontram-se nas tabelas abaixo.

Tabela 4.57 - Taxa de recuperação a 50%

Sol. Amostra	Área pico Sulfametoxazol	Concentração real (mg/ml)	Concentração nominal (mg/ml)	TR (%)	RSD (%)
Placebo 50%	139675	0,04984	0,0500	99,74	0,04
	139557	0,04979		99,66	
	139611	0,04981		99,70	

Tabela 4.58 - Taxa de recuperação a 100%

Sol. Amostra	Área pico Sulfametoxazol	Concentração real (mg/ml)	Concentração nominal (mg/ml)	TR (%)	RSD (%)
Placebo a 100%	281808	0,0996102	0,0999	99,68	0,09
	281937	0,0996558		99,72	
	282307	0,0997866		99,86	

Tabela 4.59 - Taxa de recuperação a 150%

Sol. Amostra	Área pico Sulfametoxazol	Concentração real (mg/ml)	Concentração nominal (mg/ml)	TR (%)	RSD (%)
Placebo a 150%	421417	0,1490831	0,1499	99,46	0,03
	421171	0,1489961		99,40	
	421297	0,1490407		99,43	

Resultados		Critério	Conformidade
Média recuperação (%) =	99,63	98% - 102%	Conforme
RSD recuperação (%) =	0,16	≤2%	Conforme
máximo de recup. (%) =	99,86	102%	Conforme
mínimo de recup. (%) =	99,40	98%	Conforme

#### Homogeneidade das variâncias (teste de Cochran)

$$G_{exp} = 0,1115$$

$$G_{tab}(0,05;3;3) = 0,7977$$

Homogeneidade das variâncias das taxas de recuperação	$G_{exp} < G_{tab}$	Variância das taxas de recuperação homogênea
---	---------------------	--

Pela análise dos valores obtidos pode afirmar-se que a taxa de recuperação se encontra dentro do intervalo definido. Por sua vez, também o RSD da taxa de recuperação se apresenta abaixo do limite estabelecido.

Dado que  $G_{exp} < G_{tab}$ , então conclui-se que a variância das taxas de recuperação é homogênea, ou seja, o fator de concentração não influencia na variabilidade dos resultados.

- **Precisão**
  - **Repetibilidade**

No ensaio da repetibilidade foi avaliada a precisão do método, nas mesmas condições operativas e num curto intervalo de tempo, como tal procedeu-se a seis injeções da solução placebo com sulfametoxazol a 100% e analisou-se os resultados em termos de áreas e concentrações.

Tabela 4.60 - Resultados obtidos no ensaio da repetibilidade

<b>Sol. placebo com sulfametoxazol a 100%</b>	<b>Área sulfametoxazol</b>	<b>Concentração real (%)</b>
<b>Injeção 1</b>	277717	98,78
<b>Injeção 2</b>	277521	98,71
<b>Injeção 3</b>	277447	98,69
<b>Injeção 4</b>	277725	98,79
<b>Injeção 5</b>	277726	98,79
<b>Injeção 6</b>	277630	98,75
<b>Média =</b>	<b>277627,67</b>	<b>98,75</b>
<b>RSD% =</b>	<b>0,04</b>	<b>0,04</b>

Tendo em conta a tabela 4.60 observa-se que o RSD das áreas correspondentes às 6 injeções da solução placebo com sulfametoxazol a 100% é inferior a 1%, o que indica que o método analítico é preciso para as mesmas condições operativas num curto espaço de tempo.

- **Precisão Intermédia**

Com o objetivo de avaliar o impacto de variações laboratoriais foram realizados vários ensaios por dois analistas diferentes, em dois dias diferentes e em dois equipamentos também diferentes. Cada analista preparou três soluções placebo com sulfametoxazol a 100 % e procedeu à sua injeção em dias consecutivos e em sistemas cromatográficos diferentes.

Tabela 4.61 - Resultados obtidos pela analista 1, no dia 1 e no primeiro sistema cromatográfico (Waters 7)

<b>Sol amostra</b>	<b>Área sulfametoxazol</b>	<b>Concentração real (%)</b>	<b>Média (%)</b>	<b>RSD (%)</b>
<b>A1</b>	275436	99,564	99,397	0,77
	274583	99,257		
<b>A2</b>	279220	100,428		
	278105	100,028		
<b>A3</b>	272042	98,577		
	271907	98,528		

Tabela 4.62 - Resultados obtidos pela analista 1, no dia 2 e no segundo sistema cromatográfico (Waters 6)

Sol amostra	Área sulfametoxazol	Concentração real (%)	Média (%)	RSD (%)
A1	286116	98,264	99,844	1,88
	285964	98,212		
A2	294998	102,289		
	294569	102,14		
A3	285224	99,018		
	285578	99,141		

Tabela 4.63 - Resultados obtidos pela analista 2, no dia 1 e no primeiro sistema cromatográfico (Waters 7)

Sol amostra	Área sulfametoxazol	Concentração real (%)	Média (%)	RSD (%)
A1	278458	100,301	99,04	1,00
	278497	100,315		
A2	272850	98,536		
	273063	98,614		
A3	272019	98,283		
	271760	98,189		

Tabela 4.64 - Resultados obtidos pela analista 2, no dia 2 e no segundo sistema cromatográfico (Waters 6)

Sol amostra	Área sulfametoxazol	Concentração real (%)	Média (%)	RSD (%)
A1	281386	94,24	93,83	1,82
	282282	94,54		
A2	282045	94,433		
	287098	96,126		
A3	275944	92,2		
	273757	91,468		

A média das concentrações de sulfametoxazol obtidas é de 98,029%, apresentando um RSD de 2,88%, ou seja, inferior a 3%, o que indica que o método analítico suporta as variações laboratoriais propostas nesta validação.

- **Adequabilidade do sistema (SST)**

No estudo da adequabilidade do sistema procedeu-se a seis injeções de uma solução padrão de sulfametoxazol a 100%. Estas injeções foram realizadas em dois sistemas cromatográficos diferentes e têm o objetivo de assegurar uma performance adequada de cada um dos sistemas.

Os resultados obtidos encontram-se nas tabelas abaixo.

Tabela 4.65 - Resultados obtidos das injeções da solução no sistema cromatográfico 1 (Waters 7)

	Resolução	Fator de simetria	Tempo de retenção	Áreas	Altura	Fator capacidade	Nº pratos teóricos
sulfametoxazol	0,00	1,05	6,60	281012,28	21697,25	7,25	7193,96
	0,00	1,05	6,61	281199,10	21711,69	7,26	7207,61
	0,00	1,05	6,61	281251,98	21674,67	7,26	7190,43
	0,00	1,05	6,61	281064,48	21698,70	7,26	7185,17
	0,00	1,05	6,61	281221,87	21702,61	7,26	7194,54
	0,00	1,05	6,61	281124,00	21688,48	7,26	7190,15
<b>média</b>	0,00	1,05	6,61	281145,62	21695,57	7,26	7193,64
<b>RSD%</b>			0,04	0,03	0,06		

Tabela 4.66 - Resultados obtidos das injeções da solução no sistema cromatográfico 2 (Waters 6)

	Resolução	Fator de simetria	Tempo de retenção	Áreas	Altura	Fator capacidade	Nº pratos teóricos
sulfametoxazol	0,00	1,24	6,62	286991,20	18510,53	7,27	4838,45
	0,00	1,24	6,62	286101,10	18439,51	7,28	4804,37
	0,00	1,25	6,62	286195,50	18451,77	7,27	4811,74
	0,00	1,25	6,63	286229,65	18476,53	7,28	4835,90
	0,00	1,24	6,62	285401,20	18444,49	7,27	4797,03
	0,00	1,25	6,62	286287,30	18410,30	7,27	4771,88
<b>média</b>	0,00	1,25	6,62	286200,99	18455,52	7,27	4809,90
<b>RSD%</b>			0,06	0,18	0,19		

Todos os critérios de aceitação definidos para esta adequabilidade do sistema são cumpridos, tanto para o sistema cromatográfico 1 (Waters 7) como para o sistema cromatográfico 2 (Waters 6). Conclui-se assim que ambos os sistemas cromatográficos permitem assegurar uma performance adequada.

- **Robustez**

Com o objetivo de avaliar a capacidade do método analítico em permanecer inalterado face a pequenas variações nos seus fatores foi utilizado o desenho fatorial de Plackett-Burman, onde foram efetuados 7 ensaios fazendo variar 8 fatores diferentes, consoante a tabela 3.18.

Os principais resultados encontram-se descritos a seguir.

Tabela 4.67 - Resultados obtidos para o ensaio 1

<b>Ensaio 1</b>				
	<b>Padrão A</b>	<b>Padrão B</b>	<b>Padrão C</b>	<b>Sol placebo 100%</b>
Área pico sulfametoxazol ( $\mu\text{V}\cdot\text{seg}$ )	96874	196247	298597	196976
	99205	196460	298079	196731
Média	98040	196354	298338	196854
% RSD	1,68	0,08	0,12	0,09

<b>Sol placebo 100%</b>	<b>Concentração (%)</b>	
	98,79	média
	98,67	98,73

Tabela 4.68 - Resultados obtidos para o ensaio 2

<b>Ensaio 2</b>				
	<b>Padrão A</b>	<b>Padrão B</b>	<b>Padrão C</b>	<b>Sol placebo 100%</b>
Área pico sulfametoxazol ( $\mu\text{V}\cdot\text{seg}$ )	128197	254293	385760	254873
	128270	253385	385958	254531
Média	128234	253839	385859	254702
% RSD	0,04	0,25	0,04	0,09

<b>Sol placebo 100%</b>	<b>Concentração (%)</b>	
	98,83	média
	98,70	98,77



Tabela 4.69 - Resultados obtidos para o ensaio 3

<b>Ensaio 3</b>				
	<b>Padrão A</b>	<b>Padrão B</b>	<b>Padrão C</b>	<b>Sol placebo 100%</b>
Área pico sulfametoxazol ( $\mu\text{V} \cdot \text{seg}$ )	151913	300774	461378	304796
	152707	303005	460018	304841
Média	152310	301890	460698	304819
% RSD	0,37	0,52	0,21	0,01

<b>Sol placebo 100%</b>	<b>Concentração (%)</b>	
	99,20	média
	99,22	99,21

Tabela 4.70 - Resultados obtidos para o ensaio 4

<b>Ensaio 4</b>				
	<b>Padrão A</b>	<b>Padrão B</b>	<b>Padrão C</b>	<b>Sol placebo 100%</b>
Área pico sulfametoxazol ( $\mu\text{V} \cdot \text{seg}$ )	167147	330853	503728	332170
	167629	331189	502452	332010
Média	167388	331021	503090	332090
% RSD	0,20	0,07	0,18	0,03

<b>Sol placebo 100%</b>	<b>Concentração (%)</b>	
	98,77	média
	98,72	98,74

Tabela 4.71 - Resultados obtidos para o ensaio 5

<b>Ensaio 5</b>				
	<b>Padrão A</b>	<b>Padrão B</b>	<b>Padrão C</b>	<b>Sol placebo 100%</b>
Área pico sulfametoxazol ( $\mu\text{V}\cdot\text{seg}$ )	81082	160998	247116	161810
	81646	160777	246513	161832
Média	81364	160888	246815	161821
% RSD	0,49	0,10	0,17	0,01

<b>Sol placebo 100%</b>	<b>Concentração (%)</b>	
	98,53	média
	98,55	98,54

Tabela 4.72 - Resultados obtidos para o ensaio 6

<b>Ensaio 6</b>				
	<b>Padrão A</b>	<b>Padrão B</b>	<b>Padrão C</b>	<b>Sol placebo 100%</b>
Área pico sulfametoxazol ( $\mu\text{V}\cdot\text{seg}$ )	107961	213288	324011	214171
	108072	212904	324305	214082
Média	108017	213096	324158	214127
% RSD	0,07	0,13	0,06	0,03

<b>Sol placebo 100%</b>	<b>Concentração (%)</b>	
	98,84	média
	98,80	98,82

Tabela 4.73 - Resultados obtidos para o ensaio 7

<b>Ensaio 7</b>				
	<b>Padrão A</b>	<b>Padrão B</b>	<b>Padrão C</b>	<b>Sol placebo 100%</b>
Área pico sulfametoxazol ( $\mu\text{V}\cdot\text{seg}$ )	76430	150657	229768	152246
	75882	150822	229968	152287
Média	76156	150740	229868	152267
% RSD	0,51	0,08	0,06	0,02

<b>Sol placebo 100%</b>	<b>Concentração (%)</b>	
	99,25	média
	99,28	99,26

Tabela 4.74 - Resultados obtidos para o ensaio 8

<b>Ensaio 8</b>				
	<b>Padrão A</b>	<b>Padrão B</b>	<b>Padrão C</b>	<b>Sol placebo 100%</b>
Área pico sulfametoxazol ( $\mu\text{V}\cdot\text{seg}$ )	100690	200264	304474	201037
	100952	199455	304420	200934
Média	100821	199860	304447	200986
% RSD	0,18	0,29	0,01	0,04

<b>Sol placebo 100%</b>	<b>Concentração (%)</b>	
	98,93	média
	98,88	98,91

A partir dos resultados obtidos calculou-se o efeito produzido por cada fator, de modo a averiguar qual o parâmetro que, face a pequenas alterações, teria um maior impacto nos resultados.

Tabela 4.75 - Concentrações em sulfametoxazol obtidas em cada ensaio

Ensaio	Concentração (%) - Resposta
1	98,73
2	98,77
3	99,21
4	98,74
5	98,54
6	98,82
7	99,26
8	98,91

Tabela 4.76 - Efeito produzido por cada fator

Fator	Efeito
1	-0,120
2	0,024
3	0,134
4	-0,329
5	0,267
6	-0,051
7	0,009

As alterações efetuadas a cada fator não produzem um efeito significativo no método analítico. Apesar disso, o fator que apresenta um maior efeito quando sujeito a pequenas alterações é a detecção eletroquímica, com um valor de 0,267.

No entanto, todas as modificações efetuadas ao método analítico produzem resultados dentro dos limites de especificação (98%-102%), permitindo concluir que o método é robusto.

- **Estabilidade das soluções**

No estudo da estabilidade das soluções foram utilizadas as soluções padrão de sulfametoxazol e uma solução placebo com sulfametoxazol a 100%. Estas soluções foram injetadas no sistema cromatográfico de acordo com as seguintes condições:

- 0, 24 e 48 horas após terem sido preparadas;
- 0 e 5 dias após guardadas a cerca de 5 °C.

De seguida são apresentados os resultados obtidos.

- Estabilidade das soluções à temperatura ambiente:

Tabela 4.77 - Resultados obtidos da estabilidade das soluções 0, 20 e 40 h após terem sido preparadas e guardadas à temperatura ambiente

	tempo (h)	áreas do sulfametoxazol	tempo (h)	áreas do sulfametoxazol	tempo (h)	áreas do sulfametoxazol
<b>Padrão A</b>	0	138997	20	139158	40	138974
	0	139155	20	139412	40	139045
	<b>média</b>	<b>139076</b>	<b>média</b>	<b>139285</b>	<b>média</b>	<b>139010</b>
<b>Padrão B</b>	0	280635	20	281281	40	284033
	0	280483	20	281388	40	282868
	<b>média</b>	<b>280559</b>	<b>média</b>	<b>281335</b>	<b>média</b>	<b>283451</b>
<b>Padrão C</b>	0	420233	20	420382	40	422653
	0	419751	20	421866	40	422224
	<b>média</b>	<b>419992</b>	<b>média</b>	<b>421124</b>	<b>média</b>	<b>422439</b>
<b>Sol placebo carregada</b>	0	286493	20	287580	40	289938
	0	286350	20	286704	40	289962
	<b>média</b>	<b>286422</b>	<b>média</b>	<b>287142</b>	<b>média</b>	<b>289950</b>

	t=20h	Conformidade	t=40h	Conformidade
RSD (%) das áreas dos picos de sulfametoxazol na solução padrão A	0,11	Conforme	0,03	Conforme
RSD (%) das áreas dos picos de sulfametoxazol na solução padrão B	0,20	Conforme	0,73	Conforme
RSD (%) das áreas dos picos de sulfametoxazol na solução padrão C	0,19	Conforme	0,41	Conforme
RSD (%) das áreas dos picos de sulfametoxazol na solução placebo carregada	0,18	Conforme	0,87	Conforme

- Estabilidade das soluções a 5 °C

Tabela 4.78 - Resultados obtidos da estabilidade das soluções 0 e 88 h após terem sido preparadas e guardadas a 5 °C

	tempo (h)	áreas do sulfametoxazol	tempo (h)	áreas do sulfametoxazol
<b>Padrão A</b>	0	136841	88	141518
	0	136617	88	141148
	<b>média</b>	<b>136729</b>	<b>média</b>	<b>141333</b>
<b>Padrão B</b>	0	275943	88	287294
	0	276135	88	283951
	<b>média</b>	<b>276039</b>	<b>média</b>	<b>285623</b>
<b>Padrão C</b>	0	409245	88	418950
	0	408859	88	420223
	<b>média</b>	<b>409052</b>	<b>média</b>	<b>419587</b>
<b>Sol placebo carregada</b>	0	276203	88	283729
	0	275639	88	282054
	<b>média</b>	<b>275921</b>	<b>média</b>	<b>282892</b>

	t=88h	Conformidade
RSD (%) das áreas dos picos de sulfametoxazol na solução padrão A	2,34	Conforme
RSD (%) das áreas dos picos de sulfametoxazol na solução padrão B	2,41	Conforme
RSD (%) das áreas dos picos de sulfametoxazol na solução padrão C	1,80	Conforme
RSD (%) das áreas dos picos de sulfametoxazol na solução placebo carregada	1,76	Conforme

O desvio entre a concentração final e a concentração inicial em ambas as condições de armazenagem (temperatura ambiente e 5 °C) é inferior a 2%, ou seja, as soluções podem ser mantidas à temperatura ambiente durante 2 dias e a cerca de 5 °C durante 4 dias.

## 5. Conclusões e propostas para trabalhos futuros

As diversas análises efetuadas a matérias primas, produto a granel e produto acabado são uma prática bastante comum na rotina laboratorial das indústrias farmacêuticas. A sua execução requer a utilização de material de laboratório adequado e isento de contaminações, sendo de extrema importância garantir que os procedimentos de limpeza dos materiais estão a ser efetuados corretamente.

Com o objetivo de proceder à qualificação da performance das três máquinas de lavar material de laboratório, o material foi contaminado com diferentes substâncias: neodisher FLA, neodisher Z, labwash, cloreto de sódio e sulfametoxazol, sendo efetuada uma análise de risco que mostrou que esta última era a substância pior caso. Inerente à qualificação, validou-se também um método analítico por HPLC para a determinação do sulfametoxazol no material.

Após a realização da análise de risco, que permitiu concluir que a substância pior caso correspondia à mais insolúvel a utilizar na qualificação, aquela que apresentava as melhores características para ser a escolhida como pior caso era o sulfametoxazol que, para além de ser insolúvel era a substância dotada de uma toxicidade mais elevada.

No decorrer dos procedimentos de qualificação das máquinas Miele G7835CD e PG8583CD, mais concretamente nos ensaios realizados com a solução contaminante de labwash, constatou-se que o neutralizante utilizado estava a contaminar o material, como tal, este foi substituído por água purificada nos programas de lavagem respetivos. Após esta alteração aos programas de lavagem destas duas máquinas, verificou-se que os equipamentos passaram a executar uma lavagem eficaz do material em estudo, assegurando que as águas resultantes do enxaguamento do material apresentavam valores dentro dos limites de aceitação estabelecidos, através das técnicas de condutividade, carbono orgânico total (TOC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Como tal, conclui-se assim que a performance destes dois equipamentos se encontra conforme.

Relativamente à máquina Miele G7733, após a realização da qualificação de performance conclui-se que esta se encontra conforme, uma vez que as concentrações, valores de condutividade e de TOC obtidos pelos diferentes métodos se situam abaixo dos limites de aceitação impostos, garantindo assim a eficiência do procedimento de lavagem.

O método analítico para a determinação de sulfametoxazol por HPLC mostrou ser seletivo, linear ( $r=0,99993$ ), exato (Taxa média de recuperação=99,63%), preciso ( $CV=2,88\%$ ) e robusto (as alterações efetuadas a cada fator não produzem um efeito significativo no método analítico), cumprindo todos os critérios de aceitação estabelecidos. O limite de deteção obtido tem o valor de 0,211% e o limite de quantificação 0,213%. Foi também testada a estabilidade das soluções padrão e solução placebo reforçada, sendo que estas podem ser mantidas à temperatura ambiente durante 2 dias e, a cerca de 5 °C, durante 4 dias.

Dado que a substituição do neutralizante por água purificada se trata de uma situação temporária, propõe-se que, futuramente, se proceda à eliminação total deste do programa de lavagem das máquinas, uma vez que já se provou, neste trabalho, que a inexistência de neutralizante não apresenta impactos negativos na performance dos equipamentos. Com isso, vai ser necessário proceder de novo à realização da qualificação de operação das máquinas Miele G 7835 CD e PG 8583.

De modo a facilitar os procedimentos de qualificação das máquinas Miele G 7835 CD, PG 8583 CD e G 7733, em termos de poupança de recursos e de tempo, propõe-se que as requalificações sejam apenas efetuadas nos pontos críticos das respetivas máquinas.



## Referências bibliográficas

- [1] “Laboratórios Vitória, ‘Cronologia Histórica.’” [Online]. Available: <http://www.labvitoria.pt/pt/cronologia?mt=2>. [Accessed: 20-Feb-2017].
- [2] S. A. Laboratórios Vitória, “SITE MASTER FILE,” 2015.
- [3] European Commission, “EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use,” vol. 4, no. July, pp. 1–11, 2011.
- [4] European Commission, “EudraLex - The Rules Governing Medicinal Products in the European Union - EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use Introduction Document History Update of the text and introduction of a new Part III,” no. January 1992, 2010.
- [5] “ICH Home.” [Online]. Available: <http://www.ich.org/home.html>.
- [6] J. Pogány, “ICH pharmaceutical quality system Q10,” *WHO Drug Inf.*, vol. 22, no. 3, pp. 177–181, 2008.
- [7] “Sistema de Gestão da Qualidade.” [Online]. Available: <http://www.farmaceuticas.com.br/saiba-tudo-sobre-sistema-de-gestao-da-qualidade/>. [Accessed: 24-Feb-2017].
- [8] “EudraLex - Volume 4 - Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines.” [Online]. Available: [https://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4\\_en](https://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4_en) . [Accessed: 24-Feb-2017].
- [9] EFMHACA, “Good Manufacturing Practice Guideline for Pharmaceutical Products,” *Ethiop. Food, Medician Healthc. Adm. Control Auth. ( EFMHACA)*, vol. First Edit, no. Addis Ababa, Ethiopia, pp. 82–86, 2014.
- [10] “European Medicine Agency, ‘About Us.’” [Online]. Available: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about\\_us/document\\_listing/document\\_listing\\_000426.jsp&mid=](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about_us/document_listing/document_listing_000426.jsp&mid=) . [Accessed: 25-Feb-2017].
- [11] “INFARMED, ‘Apresentação.’” [Online]. Available: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/apresentacao> . [Accessed: 25-Feb-2017].
- [12] “Infarmed, ‘Documentação e informação.’” [Online]. Available: [http://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/documentacao\\_e\\_informacao/publicacoes/tematicos/farmacopeia-portuguesa](http://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/documentacao_e_informacao/publicacoes/tematicos/farmacopeia-portuguesa) . [Accessed: 25-Feb-2017].
- [13] “U.S. Food and Drug Administration, ‘About Us.’” [Online]. Available: <https://www.fda.gov/AboutFDA/Transparency/Basics/ucm194879.htm> . [Accessed: 25-Feb-2017].
- [14] R. Nash and A. Wachter, *Pharmaceutical Process Validation*, 3rd ed. 2003.
- [15] C. Regional, *Guia Diretrizes Indústria Farmacêutica - Guia da profissão farmacêutica*, vol. 6, no. 27. 2013.

- [16] “Lavagem de material de vidro.” [Online]. Available: [http://nolaboratorio.blogspot.pt/2016/01/lavagem-de-vidrarias\\_15.html](http://nolaboratorio.blogspot.pt/2016/01/lavagem-de-vidrarias_15.html). [Accessed: 02-Mar-2017].
- [17] Virgínia Andreia Figueiredo Rodrigues, “DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE LIMPEZA DE EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE COMPRIMIDOS DE DEXAMETASONA,” 2013.
- [18] ICH Expert Working Group, “Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients Q7,” *ICH Harmon. Trpartite Guidel.*, no. November, p. 49, 2000.
- [19] H. Aleem, Y. Zhao, S. Lord, T. McCarthy, and P. Sharratt, “Pharmaceutical process validation: an overview,” *Proc. Inst. Mech. Eng. Part E J. Process Mech. Eng.*, vol. 217, no. 2, pp. 141–151, 2003.
- [20] “Validação de Processo.” [Online]. Available: <http://www.farmaceuticas.com.br/validacao-de-processo/>. [Accessed: 02-Mar-2017].
- [21] K. B. Ahir, K. D. Singh, S. P. Yadav, H. S. Patel, and C. B. Poyahari, “Review Article Overview of Validation and Basic Concepts of Process Validation,” *Dep. Qual. Assur. SSR Coll. Pharmacy, Sayli, Silvassa, India*, vol. 3, no. 2, pp. 178–190, 2014.
- [22] European Commission, “EudraLex EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use, Annex 15: Qualification and Validation,” vol. 4, no. March, pp. 1–16, 2015.
- [23] S. A. Laboratórios Vitória, “Procedimento Técnico – Validação de métodos analíticos (RP.VAL/021).”
- [24] Ich, “ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology,” *Int. Conf. Harmon.*, vol. 1994, no. November 1996, p. 17, 2005.
- [25] B. Y. G. Shabir, “Step-by-step analytical methods validation and protocol in the quality system compliance industry,” *J. Valid. Technol.*, vol. 10, pp. 210–218, 2004.
- [26] A.E.F.I. – Asociación Española de Farmecèuticos de la Industria, *Validación de métodos analíticos*. 2001.
- [27] M. E. Swartz and I. S. Krull, “Validation of chromatographic methods,” *Pharm. Technol.*, vol. 22, no. 3, pp. 104–119, 1998.
- [28] Marcelo RibaniI; Carla Beatriz Grespan BottolliII; Carol H. CollinsII; Isabel Cristina Sales Fontes JardimII; Lúcio Flávio Costa MeloIII, “Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos,” 2004. [Online]. Available: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422004000500017](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000500017). [Accessed: 30-Mar-2017].
- [29] S. A. Laboratórios Vitória, “PROCEDIMENTO TÉCNICO – Cromatografia líquida (2.2.29 e 2.2.46 Ph. Eur.).”
- [30] D. LeBlanc, “Validated Cleaning Technologies for Pharmaceutical Manufacturing,” pp. 3, 20–30, 175–180, 2000.

- [31] “Beginners Guide to Liquid Chromatography, What Is HPLC (High Performance Liquid Chromatography)?” [Online]. Available: [http://www.waters.com/waters/en\\_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=%22en\\_US%3E%22](http://www.waters.com/waters/en_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=%22en_US%3E%22). [Accessed: 12-Apr-2017].
- [32] R. B. Chust, “Introdução à Cromatografia de Líquidos (HPLC),” *Bol. Soc. Port. Química*, pp. 43–54, 1990.
- [33] S. A. Laboratórios Vitória, “PROCEDIMENTO TÉCNICO – Funcionamento e manutenção do aparelho TOC (Total Organic Carbon Analyzer) Sievers DataPro 900 e GE Autosampler (P006569) RP.CQE/142.” [Online]. Available: <http://www.stateofheart.it/TOC-usp23.htm>.
- [34] “USP23 <643> TOTAL ORGANIC CARBON.” [Online]. Available: <http://www.stateofheart.it/TOC-usp23.htm>. [Accessed: 17-Apr-2017].
- [35] F. Vers, *Analisadores de carbono orgânico total portátil e para laboratório Sievers 5310 C Manual de operação e manutenção*. 2013.
- [36] I. Engines, “Sievers 900 Series - Total Organic Carbon Analyzers Operation and Maintenance Manual,” no. September, 2008.
- [37] J. Pinheiro, “Condutimetria,” *Univ. do Algarve*, pp. 1–8, 2004.
- [38] S. A. Laboratórios Vitória, “Condutividade (RP.CQQ/055 ).”
- [39] “Web FAES FARMA: Produtos - Medicamentos de prescripción.” [Online]. Available: <https://profesionalesalud.faesfarma.com/productos/#medicamentos-de-prescripcion>. [Accessed: 25-Apr-2017].
- [40] “TRIMETOPRIM + SULFAMETOXAZOL.” [Online]. Available: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/t074.htm>. [Accessed: 25-Apr-2017].
- [41] “Cloreto de Sódio.” [Online]. Available: <http://www.infoescola.com/compostos-quimicos/cloreto-de-sodio/>. [Accessed: 26-Apr-2017].
- [42] “Sodium-hypochlorite.” [Online]. Available: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sodium-hypochlorite.png>. [Accessed: 30-Apr-2017].
- [43] “Neodisher Z - Characteristics.” [Online]. Available: [https://www.drweigert.com/com/uploads/tx\\_product\\_manager/downloads/product/data\\_Sheet/neodisher-Z\\_MB\\_en\\_PN4202\\_2017-07-01.pdf](https://www.drweigert.com/com/uploads/tx_product_manager/downloads/product/data_Sheet/neodisher-Z_MB_en_PN4202_2017-07-01.pdf). [Accessed: 03-May-2017].
- [44] “Neodisher Z - Safety Data Sheet,” 2013. [Online]. Available: [https://www.drweigert.com/com/uploads/tx\\_product\\_manager/downloads/product/safetySheet/neodisher-Z\\_SDB\\_GBen\\_PN4202\\_2017-08-23.PDF](https://www.drweigert.com/com/uploads/tx_product_manager/downloads/product/safetySheet/neodisher-Z_SDB_GBen_PN4202_2017-08-23.PDF). [Accessed: 03-May-2017].
- [45] “neodisher LaboClean FLA.” [Online]. Available: [https://www.drweigert.com/com/uploads/tx\\_product\\_manager/downloads/product/data\\_Sheet/neodisher-LaboClean-FLA\\_MB\\_en\\_PN4112\\_2016-01-02.pdf](https://www.drweigert.com/com/uploads/tx_product_manager/downloads/product/data_Sheet/neodisher-LaboClean-FLA_MB_en_PN4112_2016-01-02.pdf). [Accessed: 03-May-2017].

- [46] "VWR LABWASH PREMIUM Powder PF," vol. 33, no. 0, p. 31078, 2014.
- [47] Cosmoquimica, "FICHA DE INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA DE PRODUTO QUÍMICO - SULFAMETOXAZOL." [Online]. Available: <http://cosmoquimica2.tempsite.ws/waUpload/0022992010151930.pdf>. [Accessed: 10-Jun-2017].
- [48] "Sulfamethoxazole." [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5329#section=Solubility>. [Accessed: 10-Jun-2017].
- [49] "Venosmil." [Online]. Available: <https://myhealthbox.eu/pt/medicamento/venosmil/1426501>. [Accessed: 10-Jun-2017].
- [50] "Venosmil-Folheto informativo." [Online]. Available: [http://app7.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=9072&tipo\\_doc=fi](http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=9072&tipo_doc=fi). [Accessed: 10-Jun-2017].
- [51] "Ficha de Dados de Segurança ACOFARMA - Mesalazina." [Online]. Available: [http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/2235-c7b9ecfacf0a18e5e6711008fafda5d27648cc11/main/files/Acido-5-aminosalicilico\\_pt.pdf](http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/2235-c7b9ecfacf0a18e5e6711008fafda5d27648cc11/main/files/Acido-5-aminosalicilico_pt.pdf). [Accessed: 10-Jun-2017].
- [52] "Mesalazine." [Online]. Available: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00244>. [Accessed: 10-Jun-2017].
- [53] "Condutividade Elétrica." [Online]. Available: <https://www.agsolve.com.br/dicas-e-solucoes/como-e-porque-medir-a-condutividade-eletrica-com-sondas-multiparametros>. [Accessed: 11-Jun-2017].
- [54] "Água para uso farmacêutico." [Online]. Available: [https://personal.us.es/mfarevalo/recursos/tec\\_far/agua-usos-farmaceuticos.pdf](https://personal.us.es/mfarevalo/recursos/tec_far/agua-usos-farmaceuticos.pdf). [Accessed: 11-Jun-2017].
- [55] Miele Professional, "Operating Instructions: Laboratory glassware washer G 7835."
- [56] Miele Professional, "Operating instructions Laboratory Glassware Washer for Laboratory Glassware and Utensils PG 8583 CD."
- [57] "EUROPEAN PHARMACOPEIA 7.0," 7<sup>th</sup> edition. [Online]. Available: <http://www.fptl.ru/biblioteka/farmacop/EP-7.0-2.pdf>. [Accessed: 20-Jun-2017].

## Anexos A

**A1 – Resultados obtidos do enxaguamento de material submetido à lavagem na máquina Miele G7835 CD**

Tabela A1.1 - Valores de TC, IC e TOC obtidos do enxaguamento do material contaminado com Labwash (Dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele G 7835 CD

	TC (ppb)	IC (ppb)	TOC (ppb)	TOC final (ppb)
<b>Branco</b>	260	202	57,1	
<b>Pipeta graduada 5 mL (1)</b>	429	294	136	78,9
<b>Pipeta graduada 5 mL (2)</b>	503	260	243	185,9
<b>Pipeta graduada 10 mL (1)</b>	650	272	379	321,9
<b>Pipeta graduada 10 mL (2)</b>	495	256	239	181,9
<b>Pipeta diferencial 20 mL (1)</b>	388	243	146	88,9
<b>Pipeta diferencial 20 mL (2)</b>	664	247	417	359,9
<b>Pipeta diferencial 50 mL (1)</b>	332	207	126	68,9
<b>Pipeta diferencial 50 mL (2)</b>	405	234	171	113,9
<b>Tubo de ensaio 1</b>	764	301	464	406,9
<b>Tubo de ensaio 2</b>	700	274	426	368,9
<b>Tubo de ensaio 3</b>	793	302	491	433,9
<b>Tubo de ensaio 4</b>	447	267	180	122,9
<b>Tubo de ensaio 5</b>	761	323	438	380,9
<b>Tubo de ensaio 6</b>	565	318	247	189,9
<b>Tubo de ensaio 7</b>	622	338	284	226,9
<b>Tubo de ensaio 8</b>	685	372	313	255,9
<b>Tubo de ensaio 9</b>	507	277	230	172,9
<b>Tubo de ensaio 10</b>	633	254	379	321,9
<b>Copo polipropileno 50 mL (1)</b>	375	243	132	74,9
<b>Copo polipropileno 50 mL (2)</b>	392	241	150	92,9
<b>Copo polipropileno 250 mL (1)</b>	978	404	573	515,9
<b>Copo polipropileno 250 mL (2)</b>	1000	317	684	626,9
<b>Proveta 50 mL (1)</b>	467	294	173	115,9
<b>Proveta 50 mL (2)</b>	486	283	202	144,9
<b>Balão volumétrico 10 mL (1)</b>	1110	313	796	738,9
<b>Balão volumétrico 10 mL (2)</b>	1190	315	876	818,9
<b>Balão volumétrico 1000 mL (1)</b>	1500	373	1130	1072,9
<b>Balão volumétrico 1000 mL (2)</b>	1260	474	786	728,9
<b>Espátula 1</b>	838	329	509	451,9
<b>Espátula 2</b>	833	297	536	478,9
<b>Pinça 1</b>	1900	418	1480	1422,9
<b>Pinça 2</b>	968	407	561	503,9

Tabela A1.2 – Valores de TC, IC e TOC obtidos do enxaguamento de material por contaminar e submetido à lavagem na máquina Miele G 7835 CD

	TC (ppb)	IC (ppb)	TOC (ppb)	TOC final (ppb)
<b>Branco</b>	270	182	87,7	
<b>Pipeta graduada 5 mL (1)</b>	1280	327	956	868,3
<b>Pipeta graduada 5 mL (2)</b>	1010	328	682	594,3
<b>Pipeta graduada 10 mL (1)</b>	765	302	464	376,3
<b>Pipeta graduada 10 mL (2)</b>	622	322	300	212,3
<b>Pipeta diferencial 20 mL (1)</b>	402	284	118	30,3
<b>Pipeta diferencial 20 mL (2)</b>	380	283	96,8	9,1
<b>Pipeta diferencial 50 mL (1)</b>	428	312	116	28,3
<b>Pipeta diferencial 50 mL (2)</b>	395	234	162	74,3
<b>Tubo de ensaio 1</b>	384	297	87,7	0
<b>Tubo de ensaio 2</b>	343	248	94,6	6,9
<b>Tubo de ensaio 3</b>	391	300	90,6	2,9
<b>Tubo de ensaio 4</b>	382	283	98,8	11,1
<b>Tubo de ensaio 5</b>	358	261	97,2	9,5
<b>Tubo de ensaio 6</b>	387	289	97,2	9,5
<b>Tubo de ensaio 7</b>	738	293	445	357,3
<b>Tubo de ensaio 8</b>	778	297	481	393,3
<b>Tubo de ensaio 9</b>	820	309	511	423,3
<b>Tubo de ensaio 10</b>	851	312	539	451,3
<b>Copo polipropileno 50 mL (1)</b>	1730	259	1470	1382,3
<b>Copo polipropileno 50 mL (2)</b>	1650	283	1370	1282,3
<b>Copo polipropileno 250 mL (1)</b>	991	417	574	486,3
<b>Copo polipropileno 250 mL (2)</b>	1040	381	661	573,3
<b>Proveta 50 mL (1)</b>	362	264	98,2	10,5
<b>Proveta 50 mL (2)</b>	379	267	113	25,3
<b>Balão volumétrico 10 mL (1)</b>	378	274	104	16,3
<b>Balão volumétrico 10 mL (2)</b>	363	273	89,9	2,2
<b>Balão volumétrico 1000 mL (1)</b>	518	345	173	85,3
<b>Balão volumétrico 1000 mL (2)</b>	696	422	274	186,3
<b>Espátula 1</b>	871	309	562	474,3
<b>Espátula 2</b>	530	287	243	155,3
<b>Pinça 1</b>	1380	385	998	910,3
<b>Pinça 2</b>	1060	353	706	618,3

Tabela A1.3 – Valores de TOC obtidos do enxaguamento de material por contaminar e submetido à lavagem na máquina Miele G 7835 CD (Máquina injeta apenas detergente e água purificada)

	TC (ppb)	IC (ppb)	TOC (ppb)	TOC final (ppb)
<b>Branco</b>	349	130	219	
<b>Pipeta graduada 5 mL (1)</b>	420	179	242	23
<b>Pipeta graduada 5 mL (2)</b>	437	210	227	8
<b>Pipeta graduada 10 mL (1)</b>	379	203	176	0
<b>Pipeta graduada 10 mL (2)</b>	456	225	231	12
<b>Pipeta diferencial 20 mL (1)</b>	399	252	147	0
<b>Pipeta diferencial 20 mL (2)</b>	465	280	185	0
<b>Pipeta diferencial 50 mL (1)</b>	398	227	171	0
<b>Pipeta diferencial 50 mL (2)</b>	366	221	144	0
<b>Tubo de ensaio 1</b>	644	335	309	90
<b>Tubo de ensaio 2</b>	497	309	189	0
<b>Tubo de ensaio 3</b>	596	359	238	19
<b>Tubo de ensaio 4</b>	617	358	259	40
<b>Tubo de ensaio 5</b>	596	341	255	36
<b>Tubo de ensaio 6</b>	452	251	201	0
<b>Tubo de ensaio 7</b>	486	266	220	1
<b>Tubo de ensaio 8</b>	527	289	238	19
<b>Tubo de ensaio 9</b>	403	231	171	0
<b>Tubo de ensaio 10</b>	495	263	232	13
<b>Copo polipropileno 50 mL (1)</b>	490	239	250	31
<b>Copo polipropileno 50 mL (2)</b>	489	244	245	26
<b>Copo polipropileno 250 mL (1)</b>	774	306	468	249
<b>Copo polipropileno 250 mL (2)</b>	769	375	394	175
<b>Proveta 50 mL (1)</b>	302	155	147	0
<b>Proveta 50 mL (2)</b>	355	162	193	0
<b>Balão volumétrico 10 mL (1)</b>	755	183	572	353
<b>Balão volumétrico 10 mL (2)</b>	858	242	616	397
<b>Balão volumétrico 1000 mL (1)</b>	1000	330	672	453
<b>Balão volumétrico 1000 mL (2)</b>	1140	335	806	587
<b>Espátula 1</b>	514	194	320	101
<b>Espátula 2</b>	643	267	376	157
<b>Pinça 1</b>	948	210	740	521
<b>Pinça 2</b>	1040	241	799	580

Tabela A1.4 - Valores de TC, IC e TOC obtidos do enxaguamento do material contaminado com Labwash (Dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele G 7835 CD

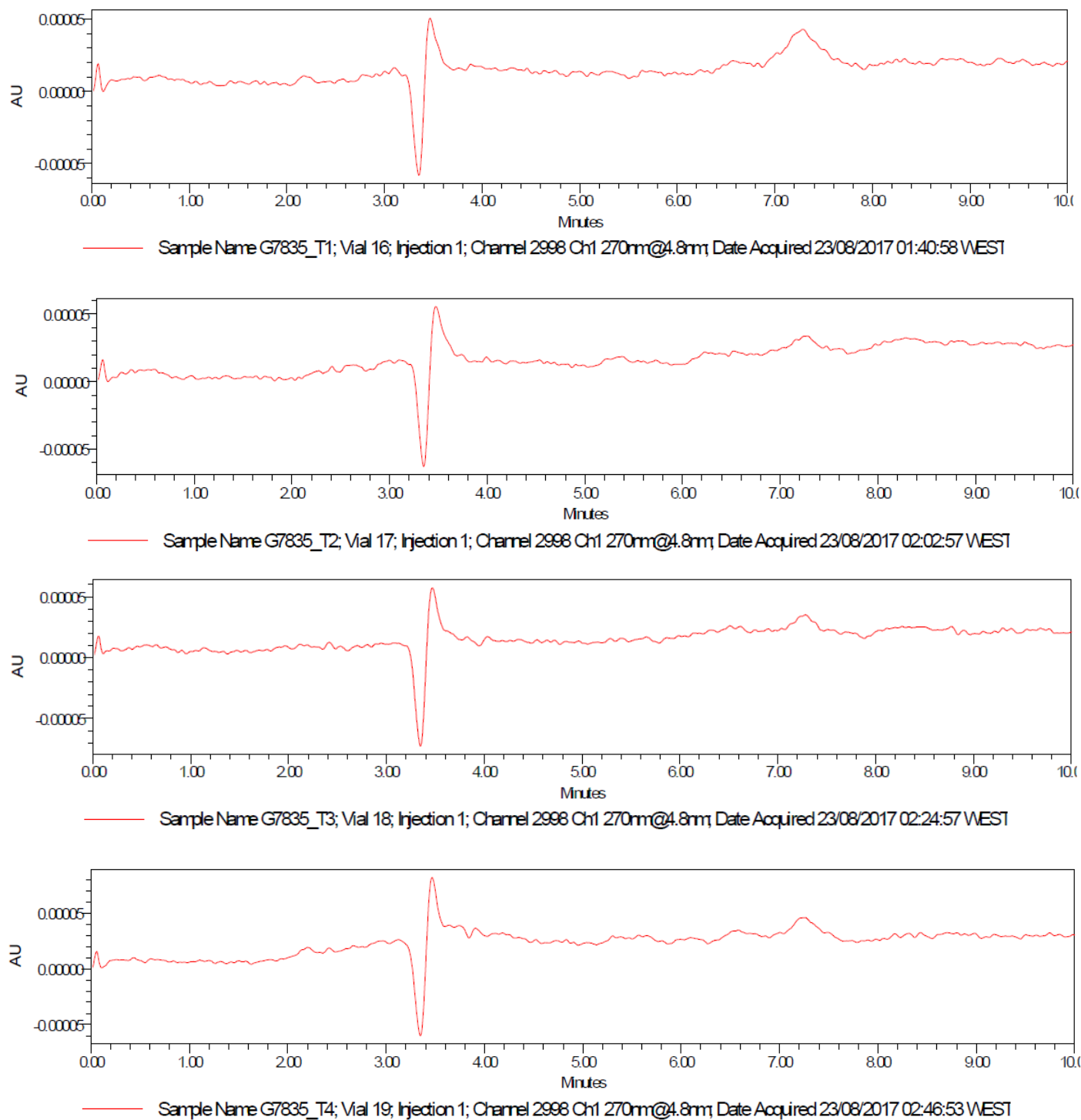
<b>Dia 1</b>				
	<b>TC (ppb)</b>	<b>IC (ppb)</b>	<b>TOC (ppb)</b>	<b>TOC final (ppb)</b>
<b>Branco</b>	179	165	14,1	
<b>Pipeta graduada 5 mL (1)</b>	480	198	282	267,9
<b>Pipeta graduada 5 mL (2)</b>	578	242	336	321,9
<b>Pipeta graduada 10 mL (1)</b>	485	222	263	248,9
<b>Pipeta graduada 10 mL (2)</b>	469	247	222	207,9
<b>Pipeta diferencial 20 mL (1)</b>	428	221	206	191,9
<b>Pipeta diferencial 20 mL (2)</b>	382	201	181	166,9
<b>Pipeta diferencial 50 mL (1)</b>	345	206	139	124,9
<b>Pipeta diferencial 50 mL (2)</b>	379	219	159	144,9
<b>Tubo de ensaio 1</b>	524	290	234	219,9
<b>Tubo de ensaio 2</b>	402	260	142	127,9
<b>Tubo de ensaio 3</b>	431	276	155	140,9
<b>Tubo de ensaio 4</b>	452	286	166	151,9
<b>Tubo de ensaio 5</b>	478	289	189	174,9
<b>Tubo de ensaio 6</b>	526	287	239	224,9
<b>Tubo de ensaio 7</b>	461	296	165	150,9
<b>Tubo de ensaio 8</b>	458	301	157	142,9
<b>Tubo de ensaio 9</b>	479	295	184	169,9
<b>Tubo de ensaio 10</b>	419	261	159	144,9
<b>Copo polipropileno 50 mL (1)</b>	389	229	160	145,9
<b>Copo polipropileno 50 mL (2)</b>	424	248	176	161,9
<b>Copo polipropileno 250 mL (1)</b>	479	247	232	217,9
<b>Copo polipropileno 250 mL (2)</b>	497	257	241	226,9
<b>Proveta 50 mL (1)</b>	379	223	156	141,9
<b>Proveta 50 mL (2)</b>	531	330	201	186,9
<b>Balão volumétrico 10 mL (1)</b>	544	270	274	259,9
<b>Balão volumétrico 10 mL (2)</b>	532	282	250	235,9
<b>Balão volumétrico 1000 mL (1)</b>	1240	767	469	454,9
<b>Balão volumétrico 1000 mL (2)</b>	856	453	403	388,9
<b>Espátula 1</b>	580	347	233	218,9
<b>Espátula 2</b>	407	270	137	122,9
<b>Pinça 1</b>	626	291	334	319,9
<b>Pinça 2</b>	655	328	327	312,9

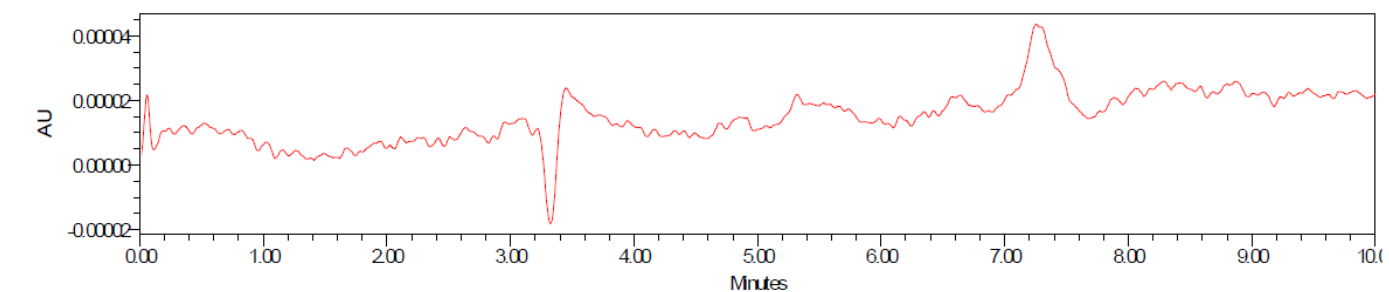


Tabela A1.5 - Valores de TC, IC e TOC obtidos do enxaguamento do material contaminado com Labwash (Dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele G 7835 CD

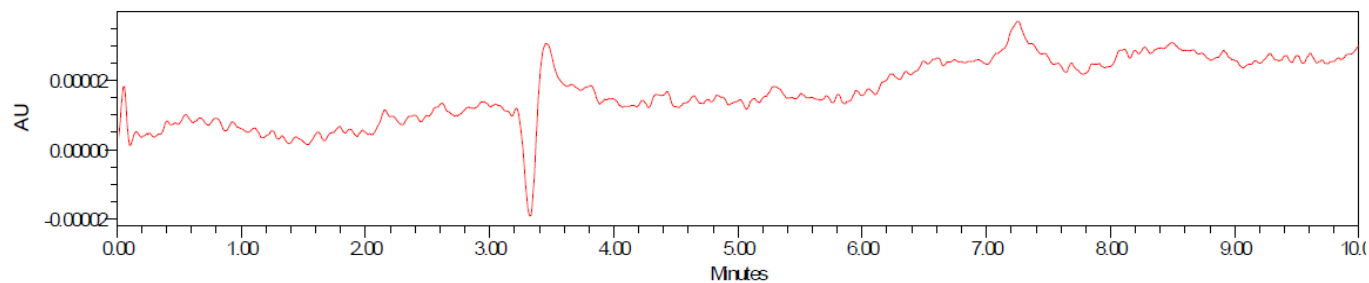
<b>Dia 2</b>				
	<b>TC (ppb)</b>	<b>IC (ppb)</b>	<b>TOC (ppb)</b>	<b>TOC final (ppb)</b>
<b>Branco</b>	158	143	15,7	
<b>Pipeta graduada 5 mL (1)</b>	550	262	289	273,3
<b>Pipeta graduada 5 mL (2)</b>	548	235	313	297,3
<b>Pipeta graduada 10 mL (1)</b>	553	227	326	310,3
<b>Pipeta graduada 10 mL (2)</b>	438	217	222	206,3
<b>Pipeta diferencial 20 mL (1)</b>	403	210	193	177,3
<b>Pipeta diferencial 20 mL (2)</b>	696	274	422	406,3
<b>Pipeta diferencial 50 mL (1)</b>	480	219	261	245,3
<b>Pipeta diferencial 50 mL (2)</b>	689	259	430	414,3
<b>Tubo de ensaio 1</b>	344	247	97,2	81,5
<b>Tubo de ensaio 2</b>	416	269	416	400,3
<b>Tubo de ensaio 3</b>	317	240	76,3	60,6
<b>Tubo de ensaio 4</b>	356	276	80,1	64,4
<b>Tubo de ensaio 5</b>	346	269	76,8	61,1
<b>Tubo de ensaio 6</b>	311	224	86,9	71,2
<b>Tubo de ensaio 7</b>	307	238	69,4	53,7
<b>Tubo de ensaio 8</b>	297	231	65,8	50,1
<b>Tubo de ensaio 9</b>	361	274	86,9	71,2
<b>Tubo de ensaio 10</b>	352	280	71,5	55,8
<b>Copo polipropileno 50 mL (1)</b>	558	253	305	289,3
<b>Copo polipropileno 50 mL (2)</b>	539	248	291	275,3
<b>Copo polipropileno 250 mL (1)</b>	637	275	362	346,3
<b>Copo polipropileno 250 mL (2)</b>	647	289	357	341,3
<b>Proveta 50 mL (1)</b>	347	218	129	113,3
<b>Proveta 50 mL (2)</b>	401	257	144	128,3
<b>Balão volumétrico 10 mL (1)</b>	261	174	87,1	71,4
<b>Balão volumétrico 10 mL (2)</b>	314	228	86,3	70,6
<b>Balão volumétrico 1000 mL (1)</b>	756	272	484	456,3
<b>Balão volumétrico 1000 mL (2)</b>	496	262	235	207,3
<b>Espátula 1</b>	343	215	128	112,3
<b>Espátula 2</b>	265	187	78,3	62,6
<b>Pinça 1</b>	793	308	484	468,3
<b>Pinça 2</b>	650	288	362	346,3

Figura A1.1 - Cromatogramas correspondentes aos materiais ensaiados na contaminação por sulfametoxazol (Dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele G 7835 CD

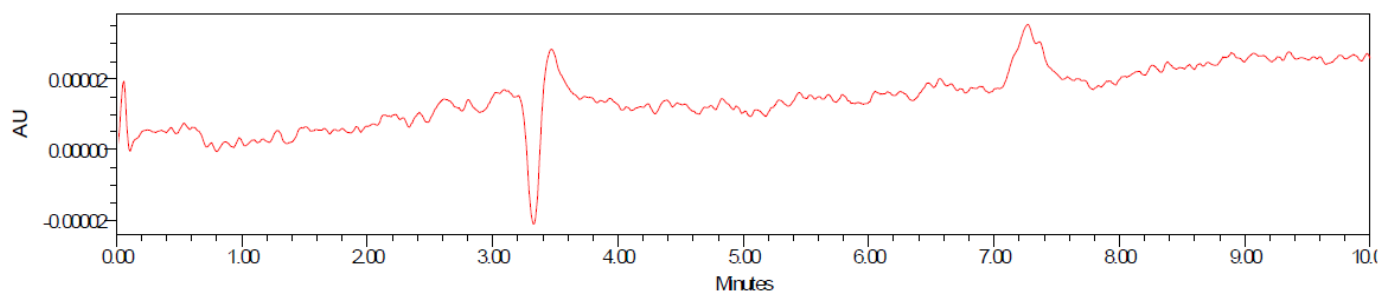




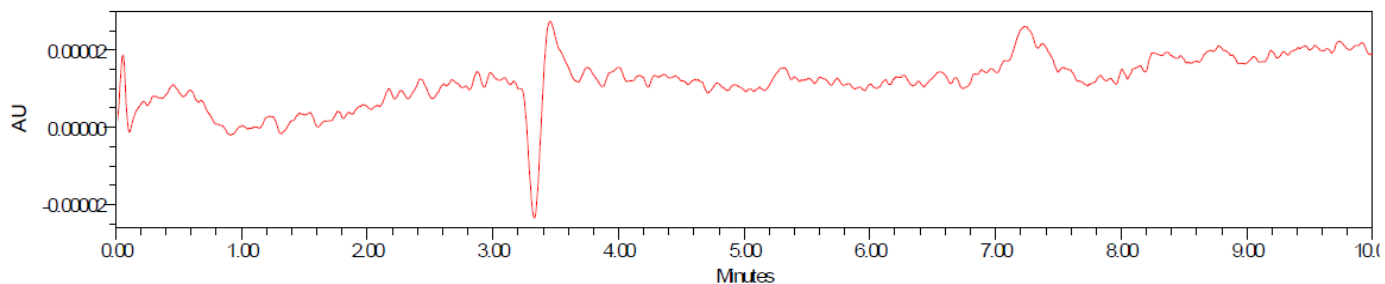
— Sample Name G7835\_T5; Vial 20; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8nm Date Acquired 23/08/2017 03:08:53 WEST



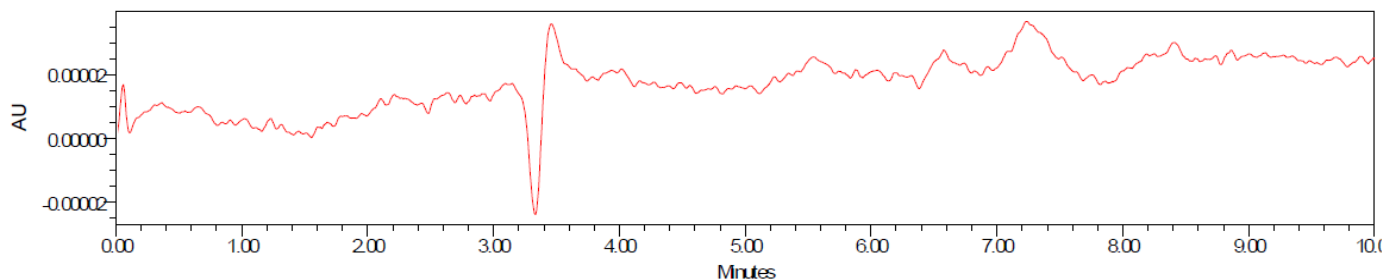
— Sample Name G7835\_T6; Vial 21; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8nm Date Acquired 23/08/2017 03:30:49 WEST



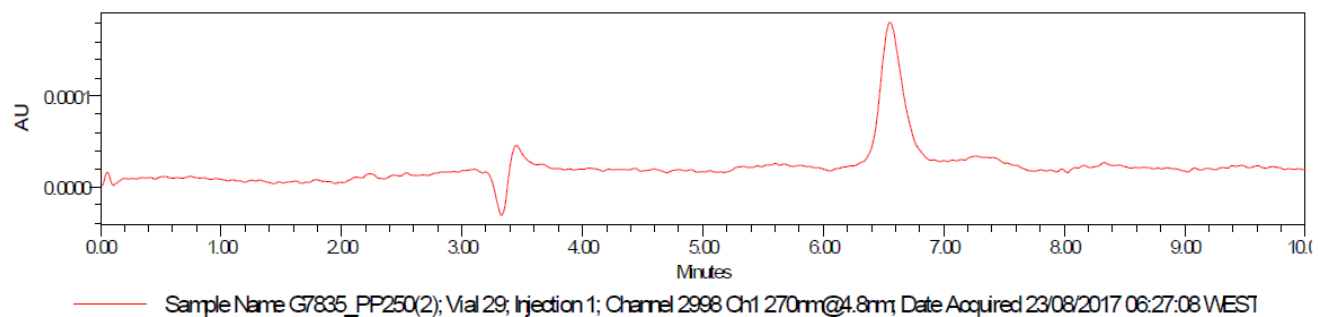
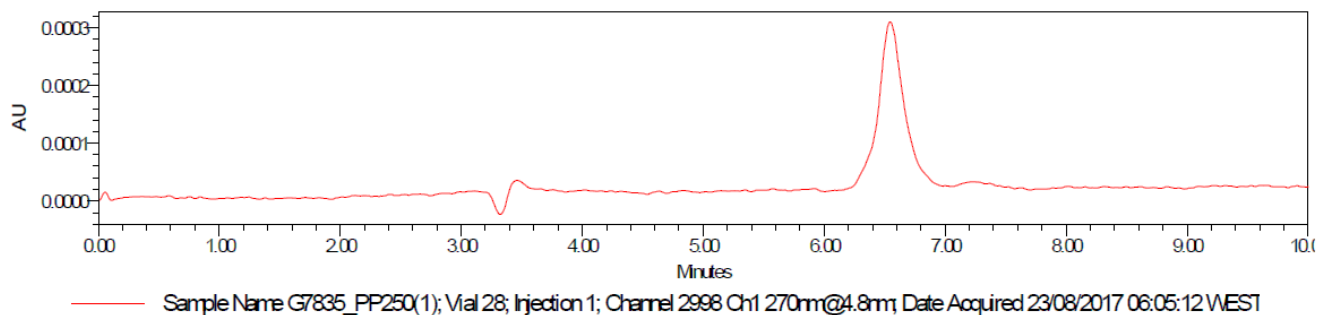
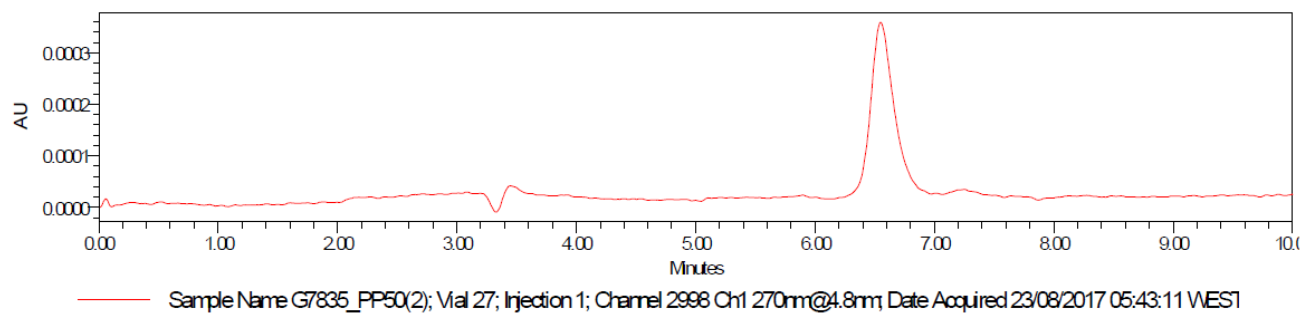
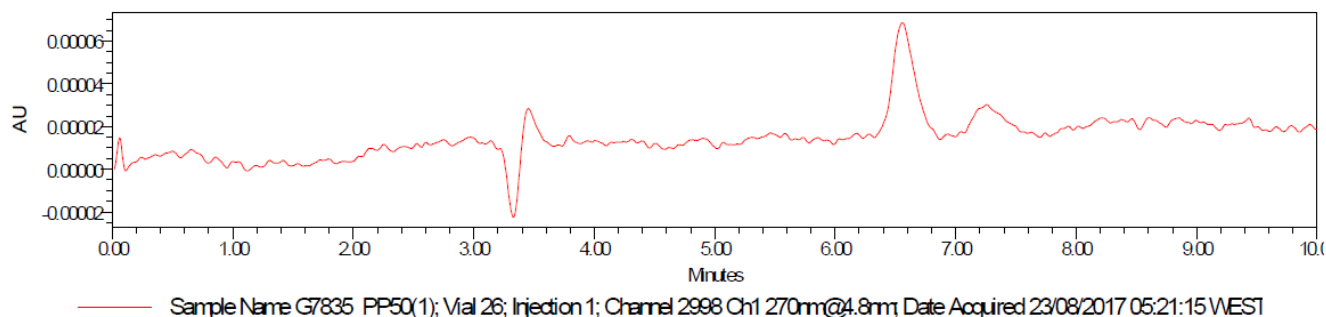
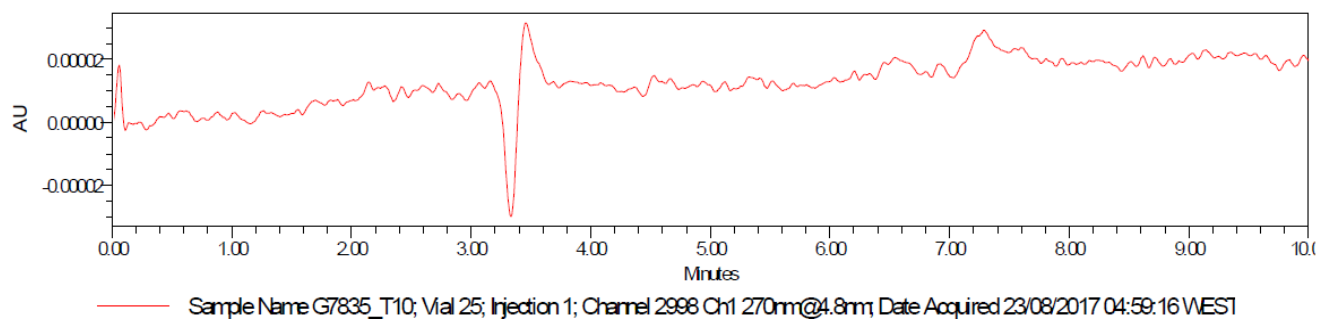
— Sample Name G7835\_T7; Vial 22; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8nm Date Acquired 23/08/2017 03:52:49 WEST

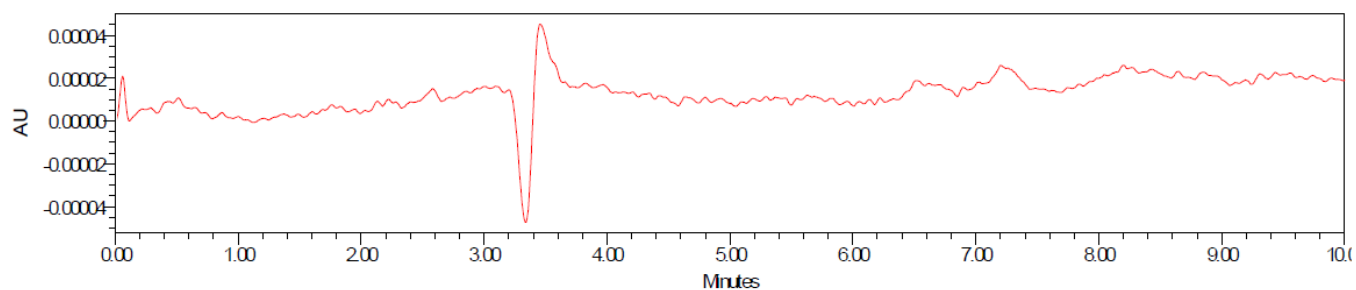


— Sample Name G7835\_T8; Vial 23; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8nm Date Acquired 23/08/2017 04:14:48 WEST

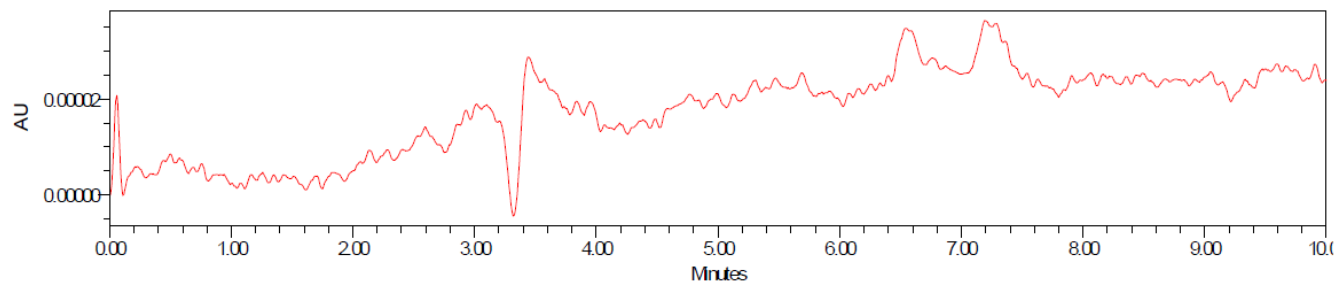


— Sample Name G7835\_T9; Vial 24; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8nm Date Acquired 23/08/2017 04:36:49 WEST

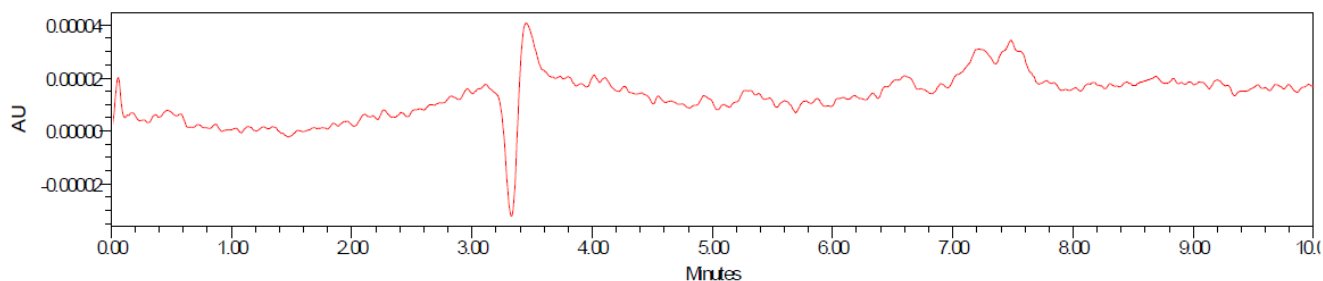




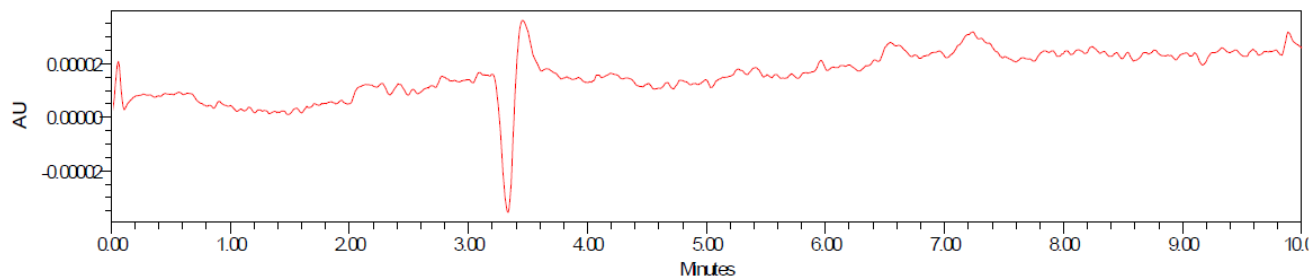
— Sample Name G7835\_PV50(1); Vial 30; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 23/08/2017 06:49:08 WEST



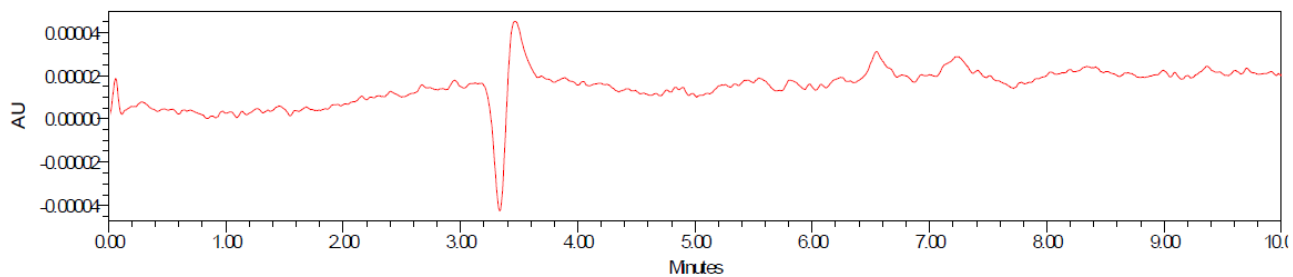
— Sample Name G7835\_PV50(2); Vial 31; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 23/08/2017 07:11:08 WEST



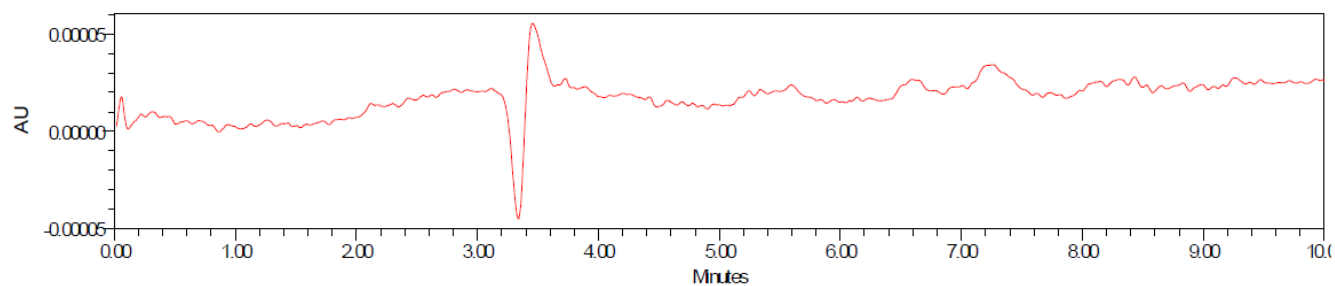
— Sample Name G7835\_PV20(1); Vial 32; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 23/08/2017 07:33:04 WEST



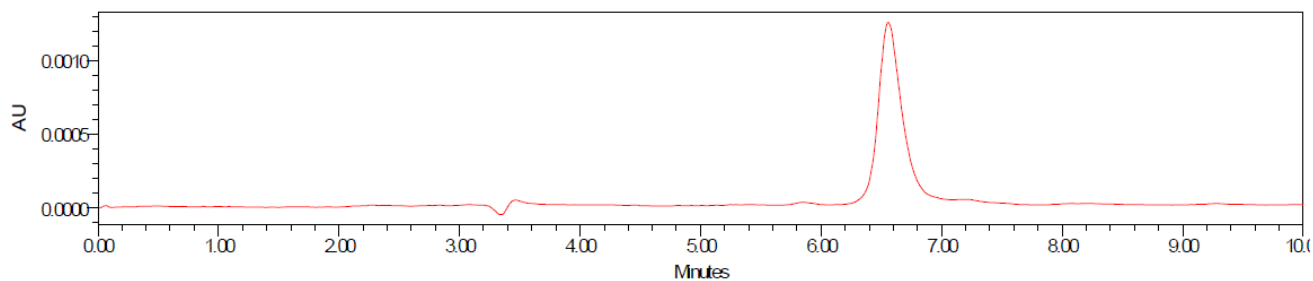
— Sample Name G7835\_PV20(2); Vial 33; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 23/08/2017 07:55:04 WEST



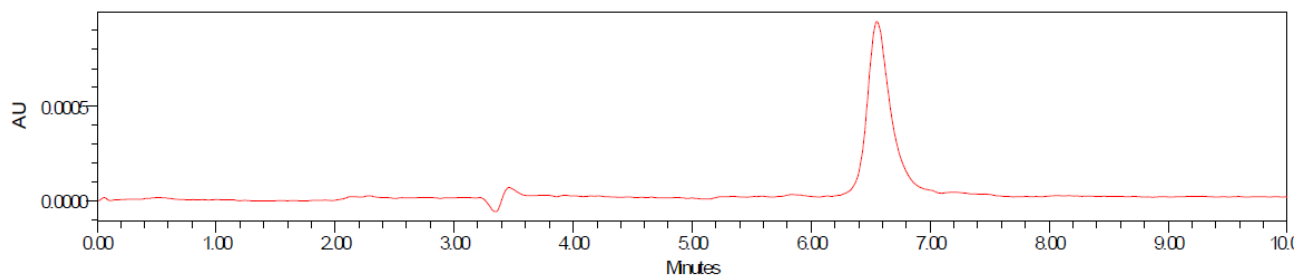
— Sample Name G7835\_ESPATULA1; Vial 34; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 23/08/2017 08:17:04 WEST



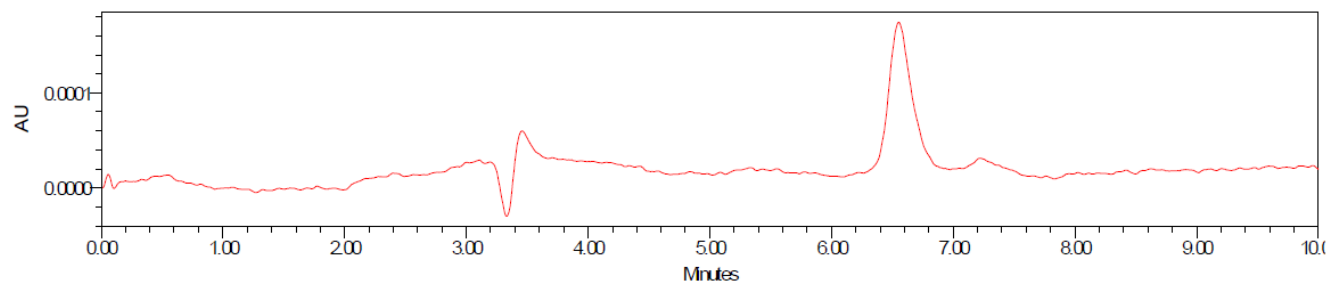
— Sample Name G7835\_ESPATULA2; Vial 35; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 23/08/2017 08:39:00 WEST



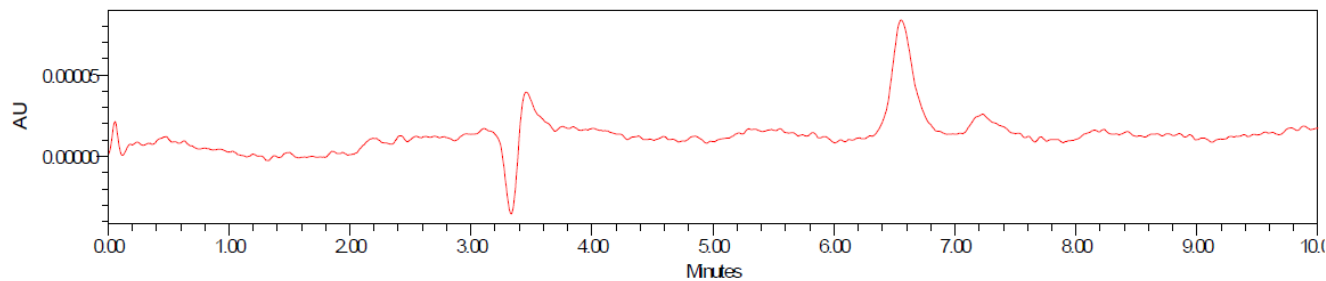
— Sample Name G7835\_PINÇA1; Vial 36; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 23/08/2017 09:00:56 WEST



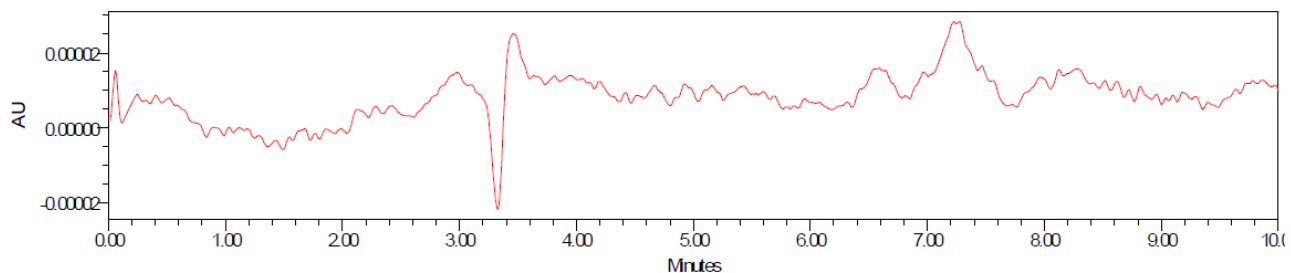
— Sample Name G7835\_PINÇA2; Vial 37; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 23/08/2017 09:22:51 WEST



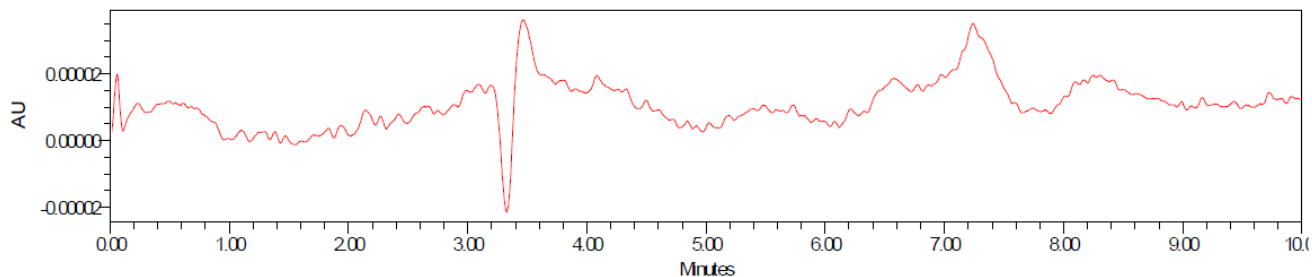
— Sample Name G7835\_BV1000(1); Vial 38; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 23/08/2017 09:44:51 WEST



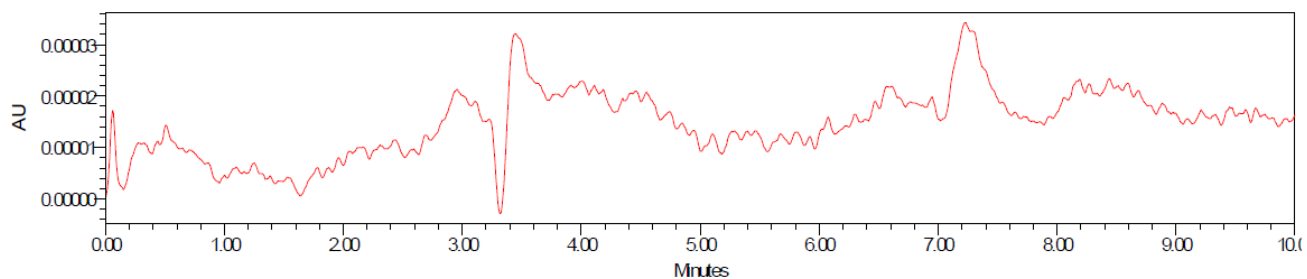
— Sample Name G7835\_BV1000(2); Vial 39; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 23/08/2017 10:06:51 WEST



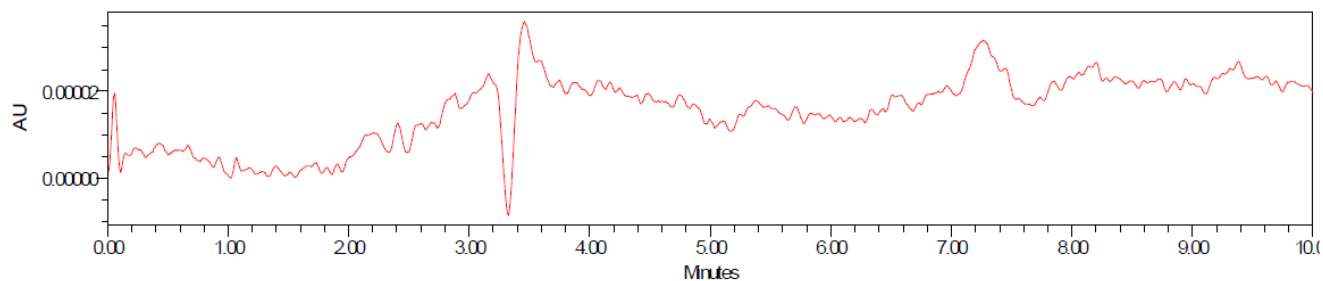
— Sample Name G7835\_BV10(1); Vial 40; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 23/08/2017 10:28:51 WEST



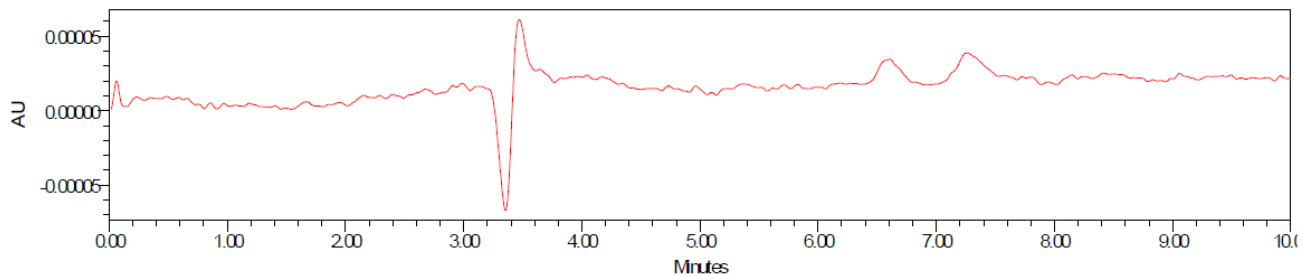
— Sample Name G7835\_BV10(2); Vial 41; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 23/08/2017 10:50:46 WEST



— Sample Name G7835\_PROV1; Vial 42; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 23/08/2017 11:12:43 WEST



— Sample Name G7835\_PROV2; Vial 43; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 23/08/2017 11:34:43 WEST



— Sample Name G7835\_PG10(1); Vial 44; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 23/08/2017 11:56:42 WEST

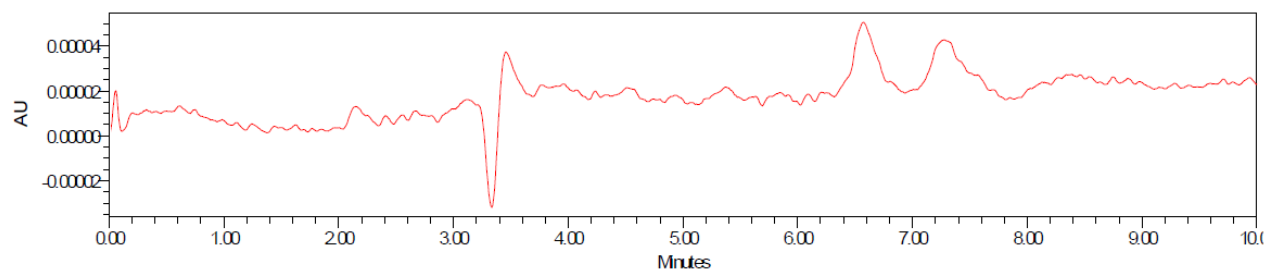
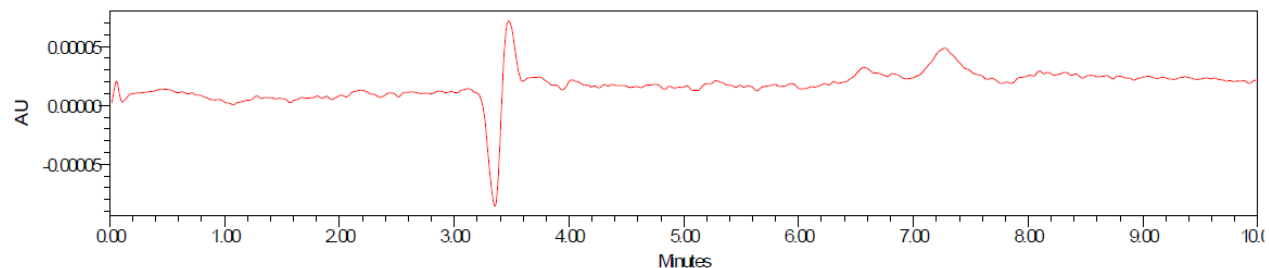
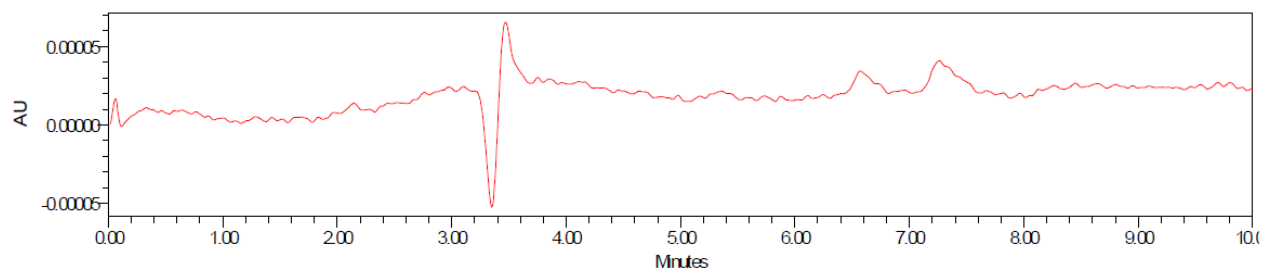
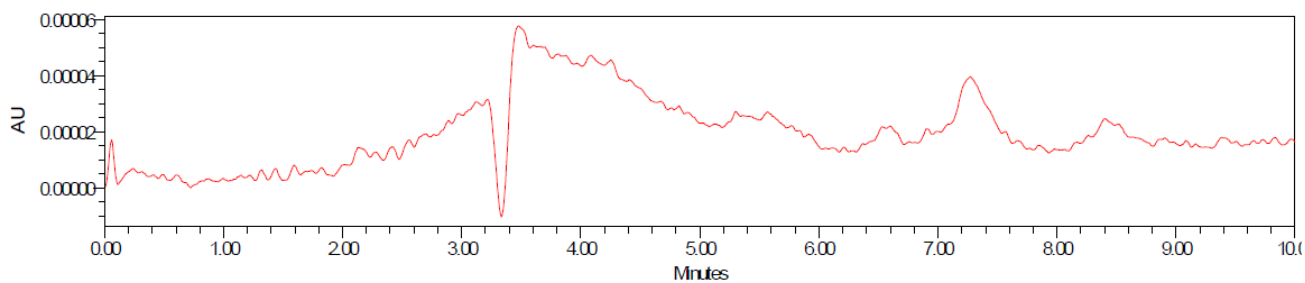
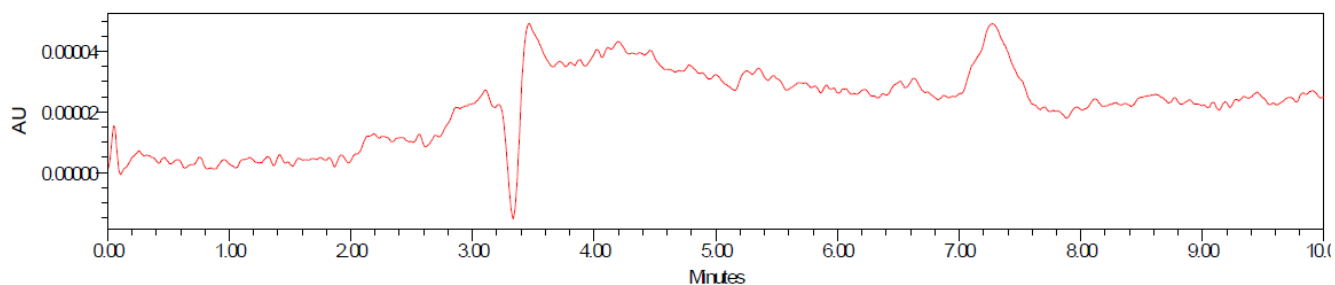
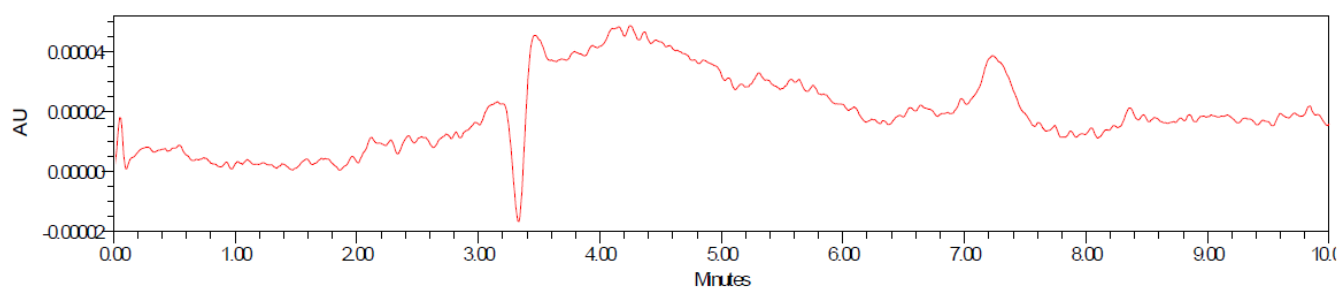
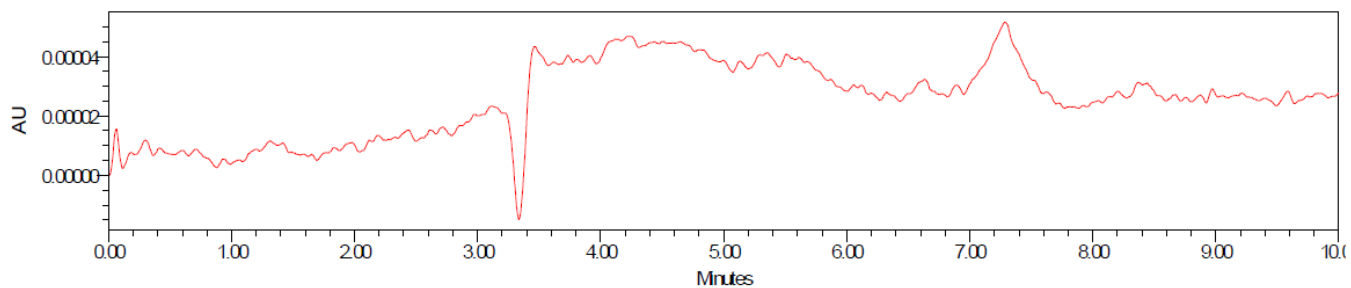
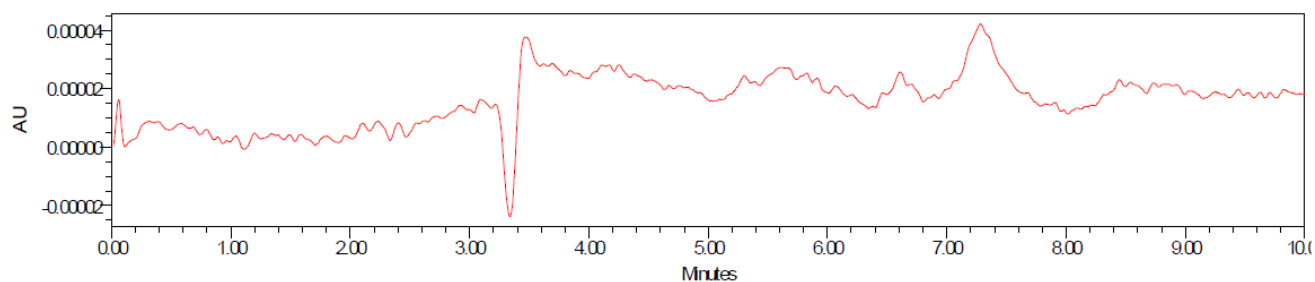


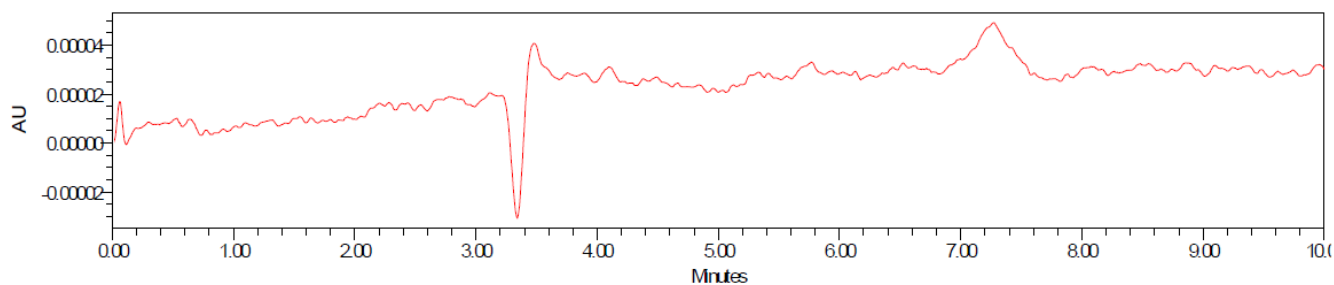


Figura A1.2 - Cromatogramas correspondentes aos materiais ensaiados na contaminação por sulfametoxazol (Dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele G 7835 CD

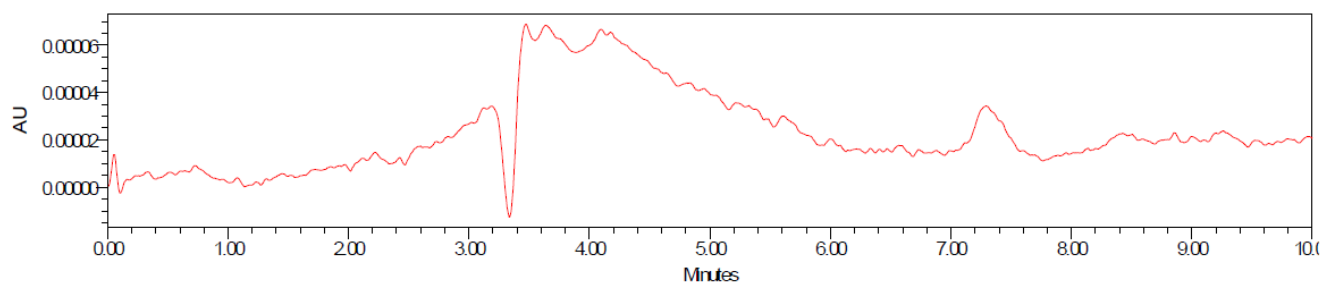




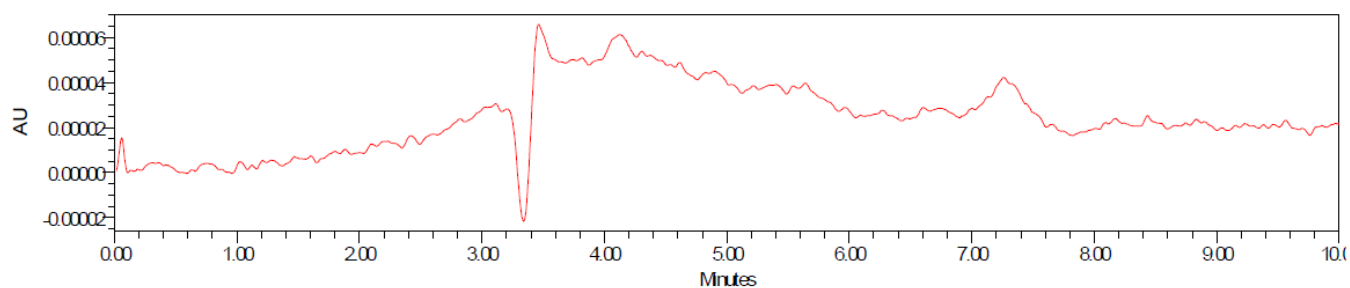
— Sample Name G7835\_T5\_Dia2; Vial 20; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 24/08/2017 01:37:00 WEST



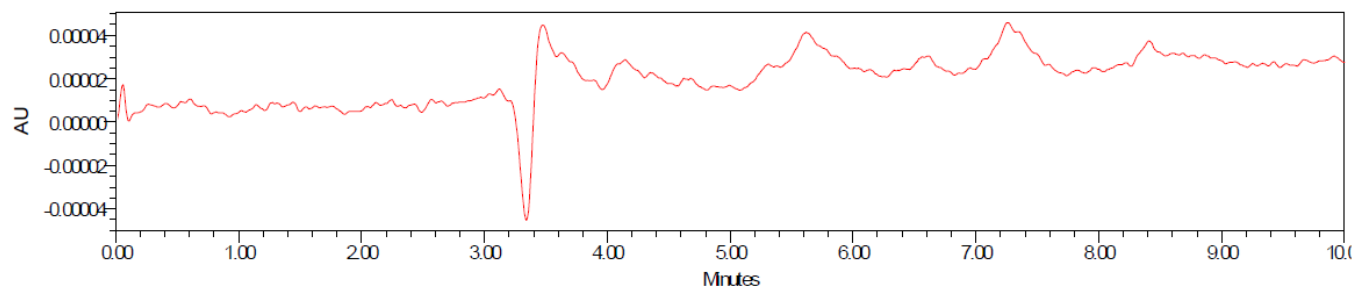
— Sample Name G7835\_T6\_Dia2; Vial 21; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 24/08/2017 01:58:59 WEST



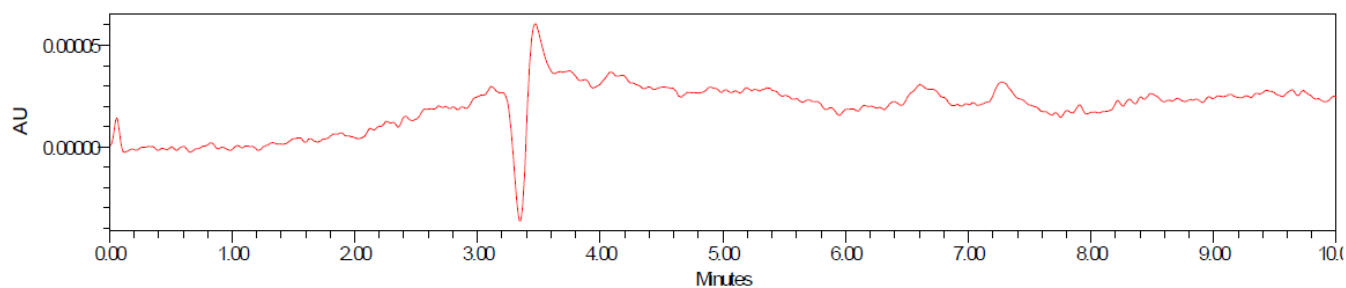
— Sample Name G7835\_T7\_Dia2; Vial 22; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 24/08/2017 02:20:58 WEST



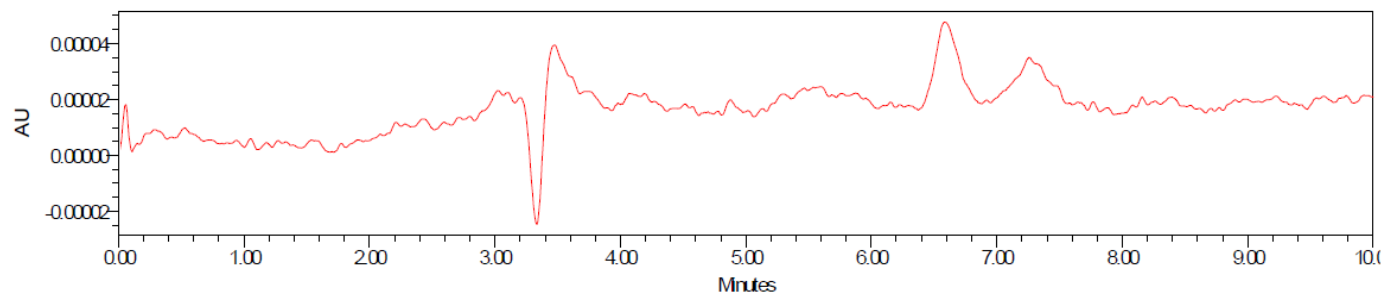
— Sample Name G7835\_T8\_Dia2; Vial 23; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 24/08/2017 02:42:54 WEST



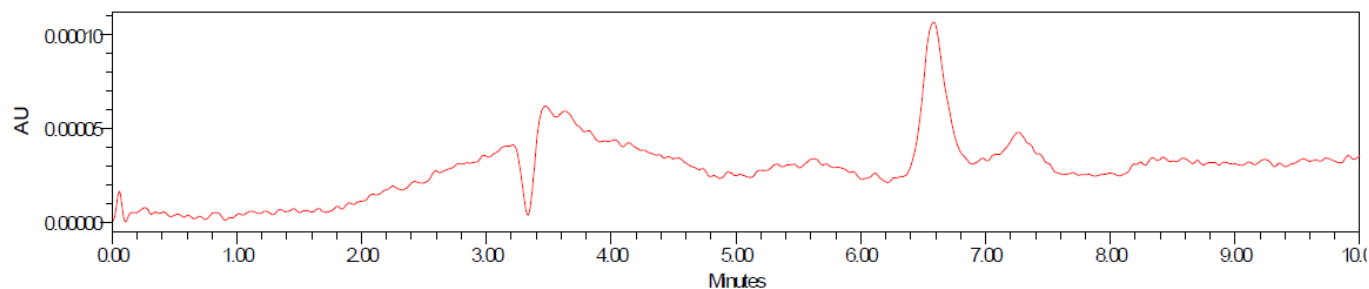
— Sample Name G7835\_T9\_Dia2; Vial 24; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 24/08/2017 03:04:50 WEST



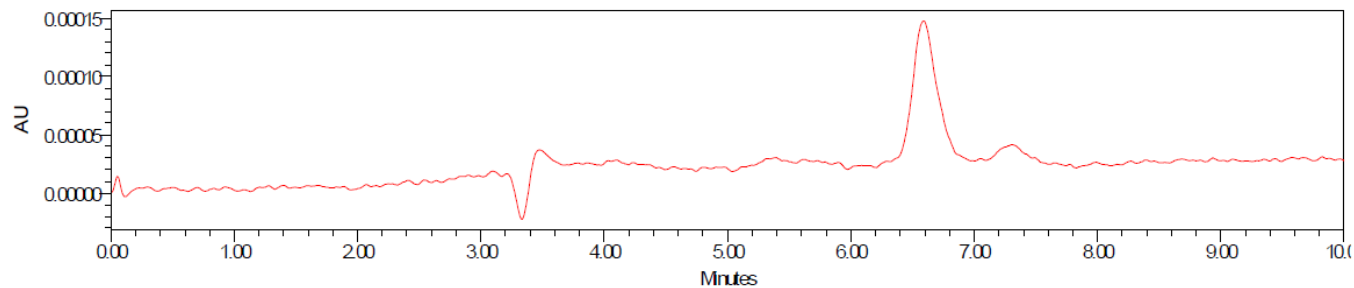
— Sample Name G7835\_T10\_Dia2; Vial 25; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 24/08/2017 03:27:19 WEST



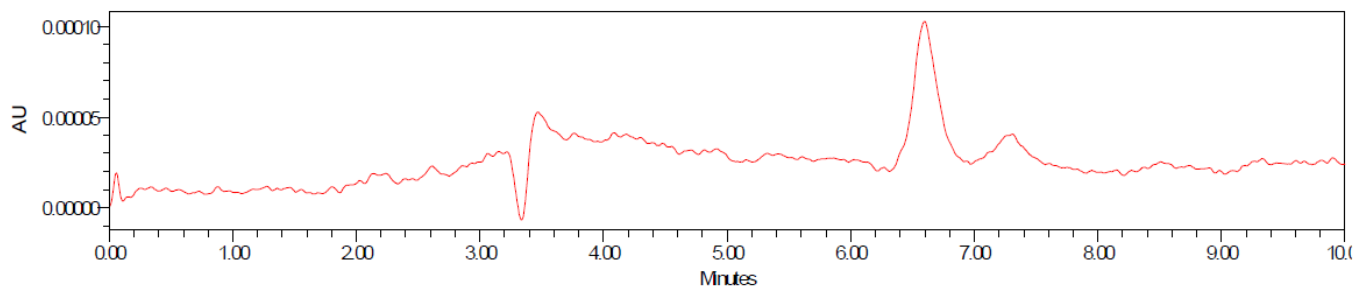
— Sample Name G7835\_PP50(1)\_Dia2; Vial 26; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 24/08/2017 03:49:19 WEST



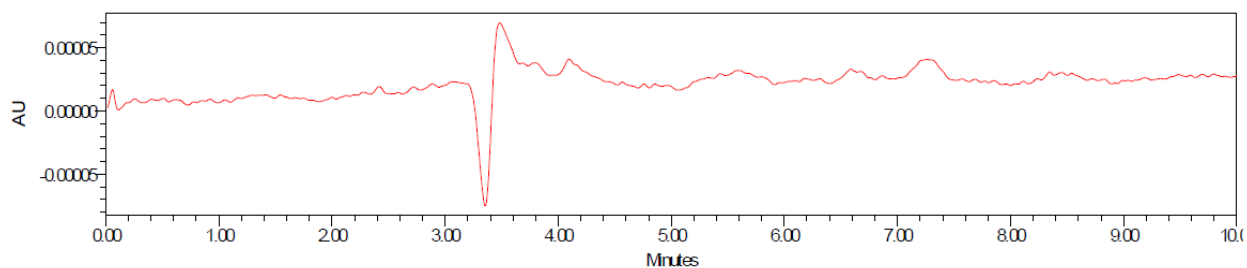
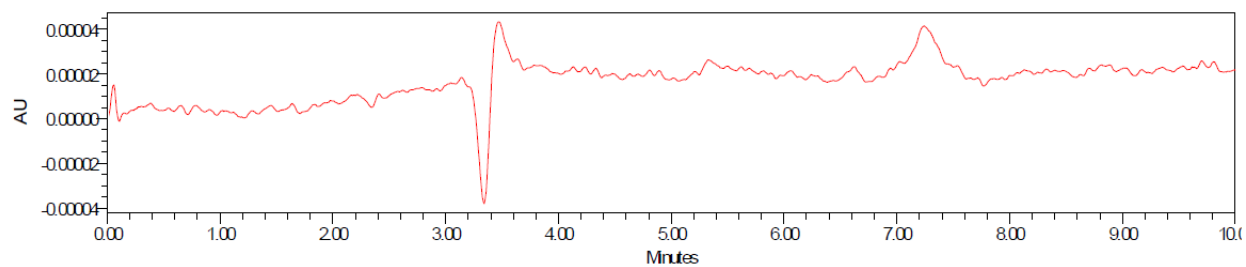
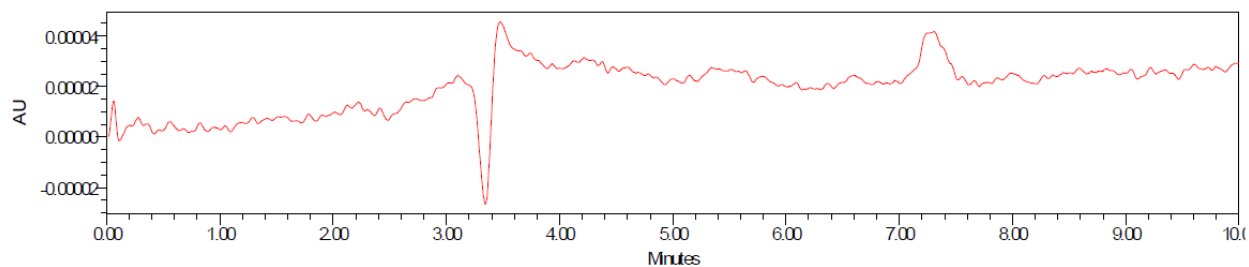
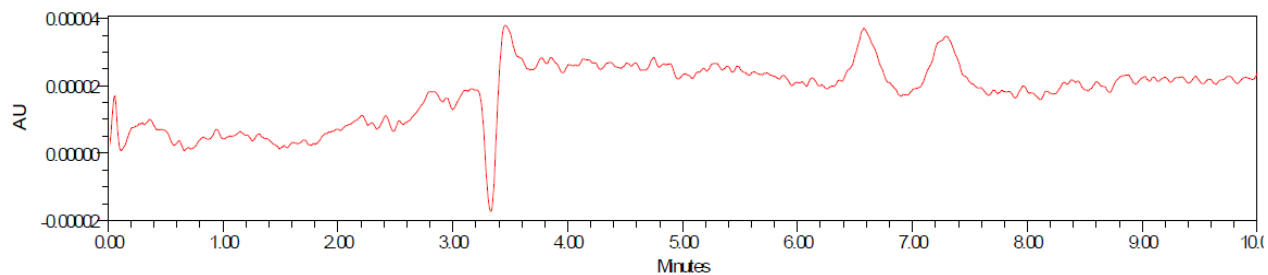
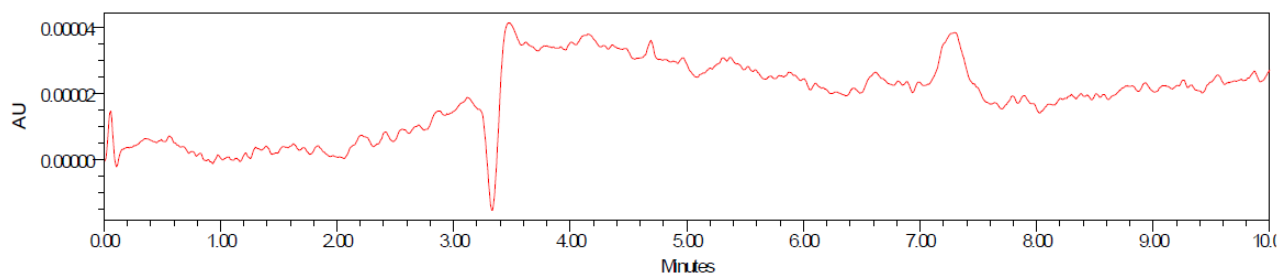
— Sample Name G7835\_PP50(2)\_Dia2; Vial 27; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 24/08/2017 04:11:15 WEST

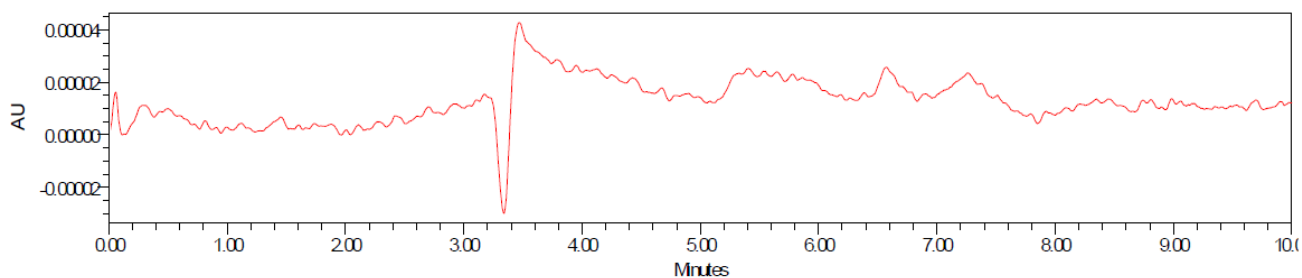
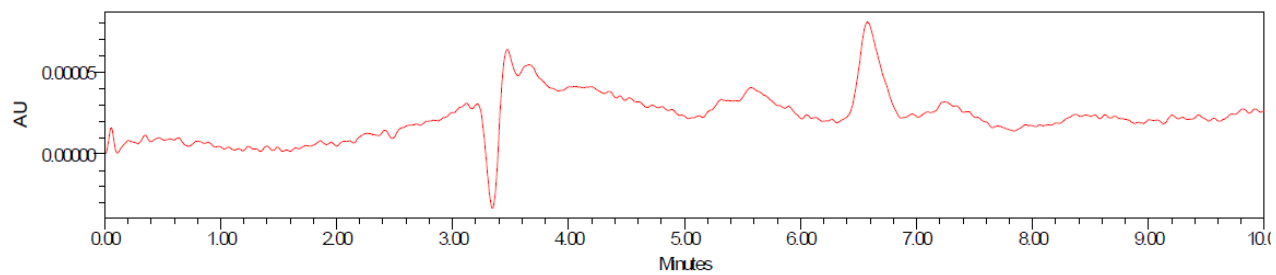
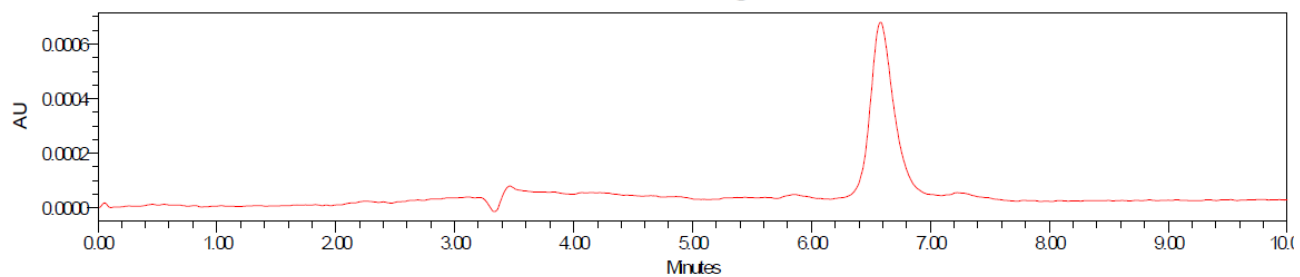
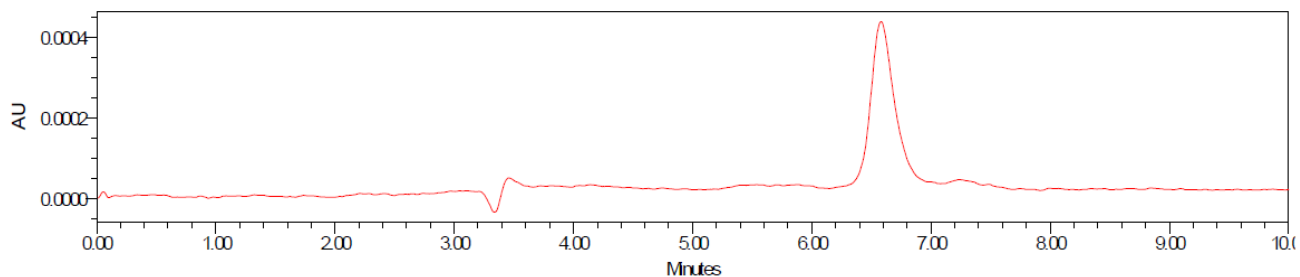
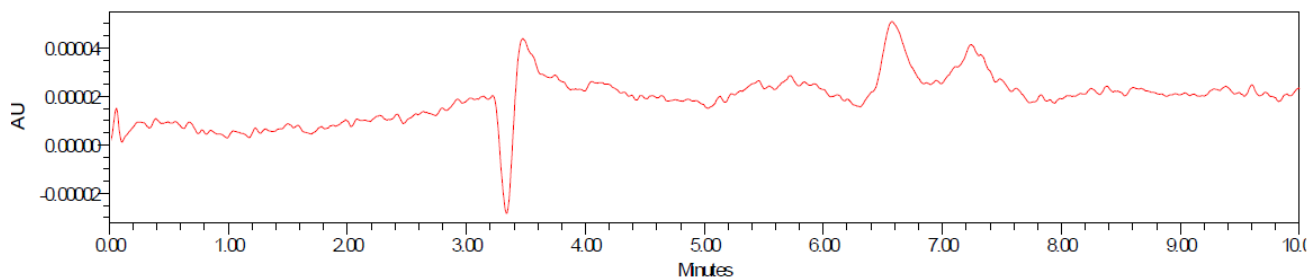


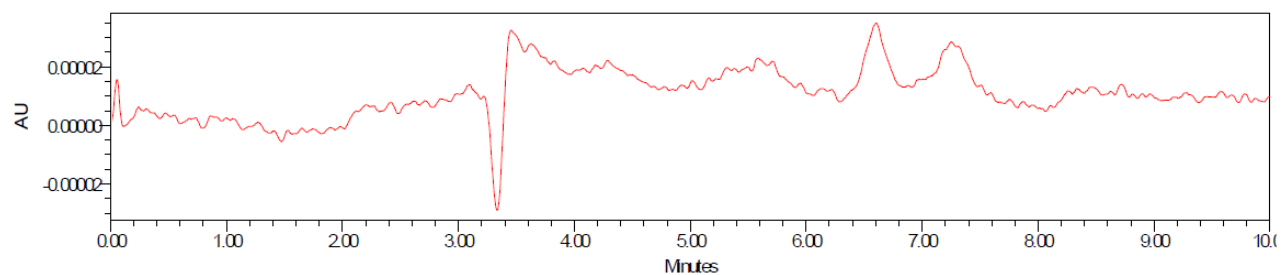
— Sample Name G7835\_PP250(1)\_Dia2; Vial 28; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 24/08/2017 04:33:13 WEST



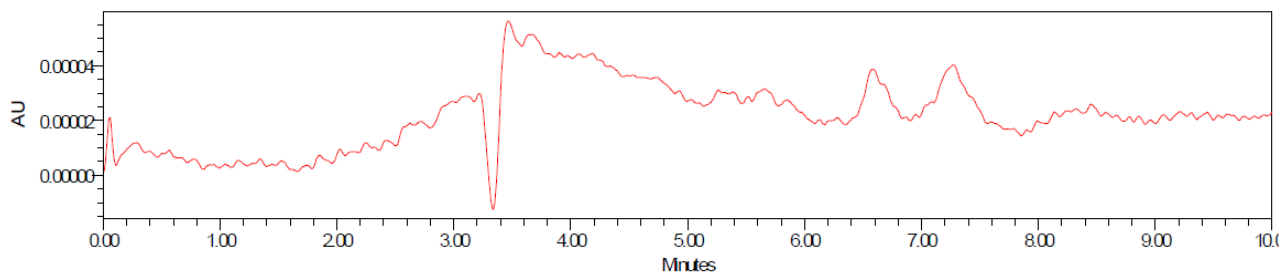
— Sample Name G7835\_PP250(2)\_Dia2; Vial 29; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 24/08/2017 04:55:13 WEST



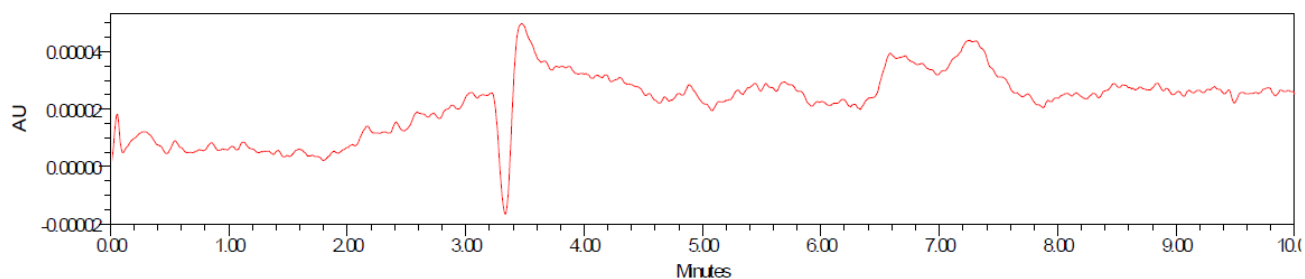




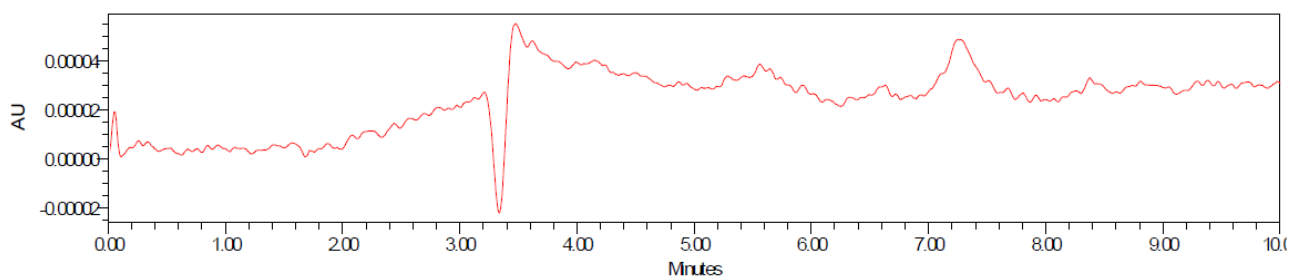
— Sample Name G7835\_BV10(1)\_Dia2; Vial 40; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8nm; Date Acquired 24/08/2017 08:57:02 WEST



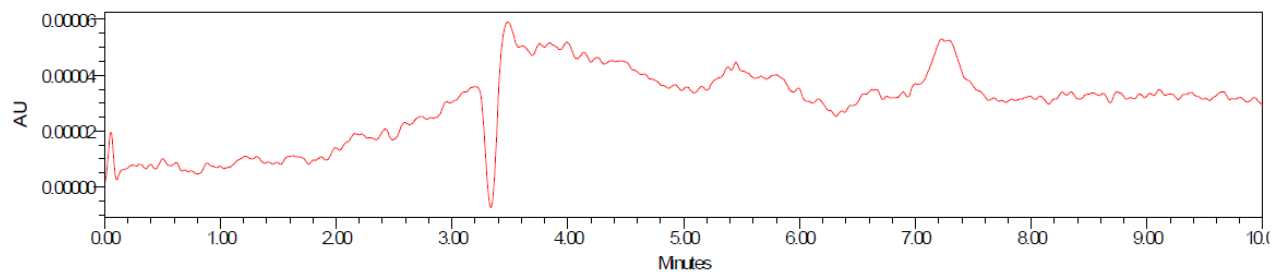
— Sample Name G7835\_BV10(2)\_Dia2; Vial 41; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8nm; Date Acquired 24/08/2017 09:19:03 WEST



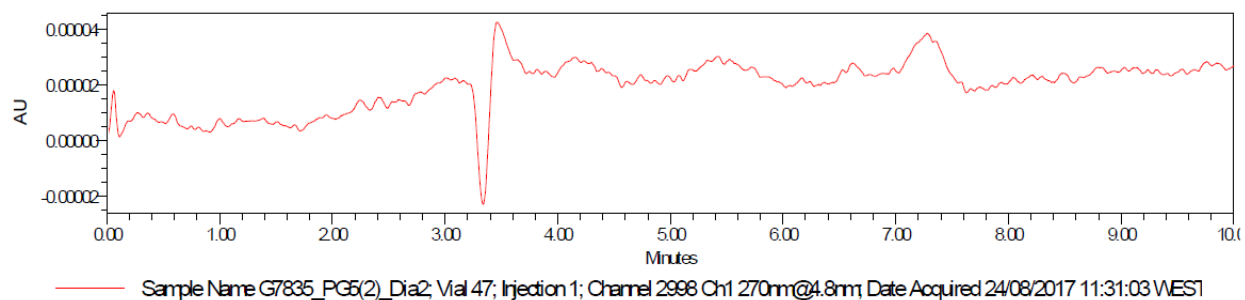
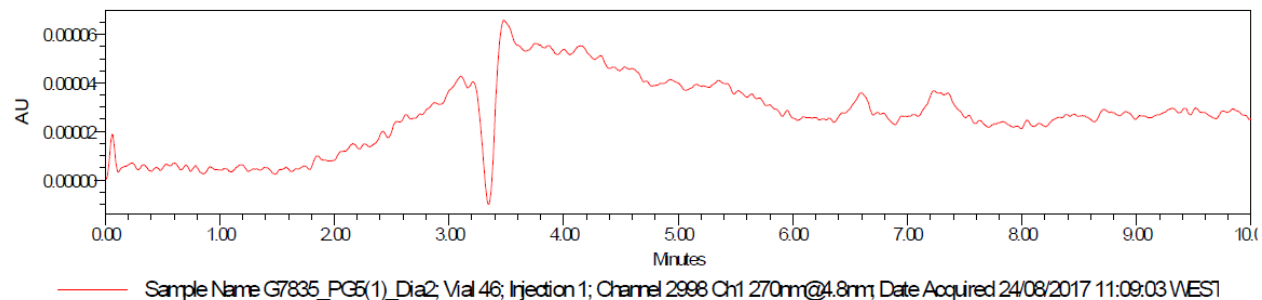
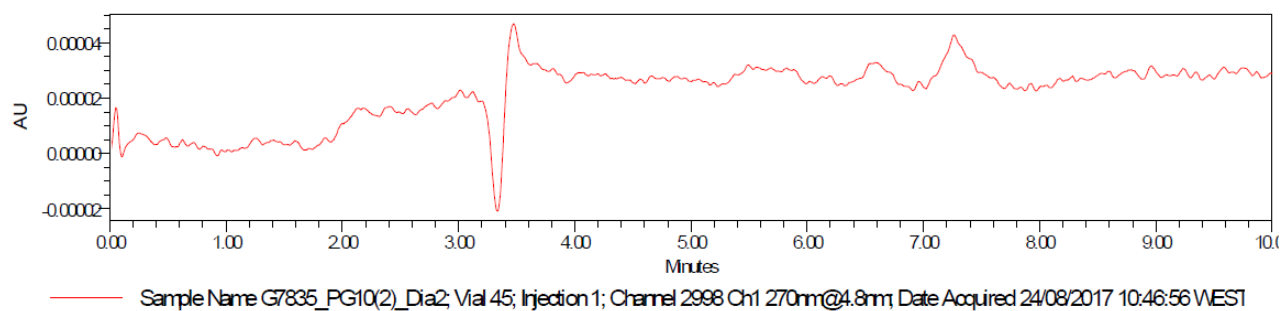
— Sample Name G7835\_PROV1\_Dia2; Vial 42; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8nm; Date Acquired 24/08/2017 09:41:02 WEST



— Sample Name G7835\_PROV2\_Dia2; Vial 43; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8nm; Date Acquired 24/08/2017 10:03:02 WEST



— Sample Name G7835\_PG10(1)\_Dia2; Vial 44; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8nm; Date Acquired 24/08/2017 10:25:01 WEST



**A2 – Resultados obtidos do enxaguamento de material submetido à lavagem na máquina Miele PG 8583 CD**

Tabela A2.1 - Valores de TC, IC e TOC obtidos do enxaguamento de material contaminado com Labwash (Dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele PG 8583 CD

<b>Dia 1</b>				
	<b>TC (ppb)</b>	<b>IC (ppb)</b>	<b>TOC (ppb)</b>	<b>TOC final (ppb)</b>
<b>Branco</b>	293	224	68,9	
<b>Pipeta graduada 5 mL (1)</b>	708	389	319	250,1
<b>Pipeta graduada 5 mL (2)</b>	1380	378	998	929,1
<b>Pipeta graduada 10 mL (1)</b>	1570	372	1200	1131,1
<b>Pipeta graduada 10 mL (2)</b>	1410	335	1070	1001,1
<b>Proveta 50 mL (1)</b>	663	369	293	224,1
<b>Proveta 50 mL (2)</b>	677	330	347	278,1
<b>Balão volumétrico 10 mL (1)</b>	569	324	245	176,1
<b>Balão volumétrico 10 mL (2)</b>	717	363	354	285,1
<b>Balão volumétrico 1000 mL (1)</b>	1150	532	617	548,1
<b>Balão volumétrico 1000 mL (2)</b>	1010	507	501	432,1

Tabela A2.2 - Valores de TC, IC e TOC obtidos do enxaguamento de material por contaminar e submetido à lavagem na máquina Miele PG 8583 CD

	<b>TC (ppb)</b>	<b>IC (ppb)</b>	<b>TOC (ppb)</b>	<b>TOC final (ppb)</b>
<b>Branco</b>	201	171	30,2	
<b>Pipeta graduada 5 mL (1)</b>	742	281	461	430,8
<b>Pipeta graduada 5 mL (2)</b>	942	312	630	599,8
<b>Pipeta graduada 10 mL (1)</b>	1070	306	766	735,8
<b>Pipeta graduada 10 mL (2)</b>	610	304	306	275,8
<b>Proveta 50 mL (1)</b>	611	247	364	333,8
<b>Proveta 50 mL (2)</b>	691	267	424	393,8
<b>Balão volumétrico 10 mL (1)</b>	400	248	152	121,8
<b>Balão volumétrico 10 mL (2)</b>	550	278	272	241,8
<b>Balão volumétrico 1000 mL (1)</b>	1100	555	541	510,8
<b>Balão volumétrico 1000 mL (2)</b>	848	349	499	468,8



Tabela A2.3 - Valores de TOC obtidos do enxaguamento de material por contaminar e submetido à lavagem na máquina Miele PG 8583 CD (Máquina injeta apenas detergente e água purificada)

	TC (ppb)	IC (ppb)	TOC (ppb)	TOC final (ppb)
<b>Branco</b>	230	187	42,8	
<b>Pipeta graduada 5 mL (1)</b>	371	252	119	76,2
<b>Pipeta graduada 5 mL (2)</b>	337	220	117	74,2
<b>Pipeta graduada 10 mL (1)</b>	323	204	119	76,2
<b>Pipeta graduada 10 mL (2)</b>	352	234	118	75,2
<b>Proveta 50 mL (1)</b>	305	208	96,3	53,5
<b>Proveta 50 mL (2)</b>	293	226	67,2	24,4
<b>Balão volumétrico 10 mL (1)</b>	384	221	162	119,2
<b>Balão volumétrico 10 mL (2)</b>	439	260	179	136,2
<b>Balão volumétrico 1000 mL (1)</b>	641	307	334	291,2
<b>Balão volumétrico 1000 mL (2)</b>	701	297	404	361,2

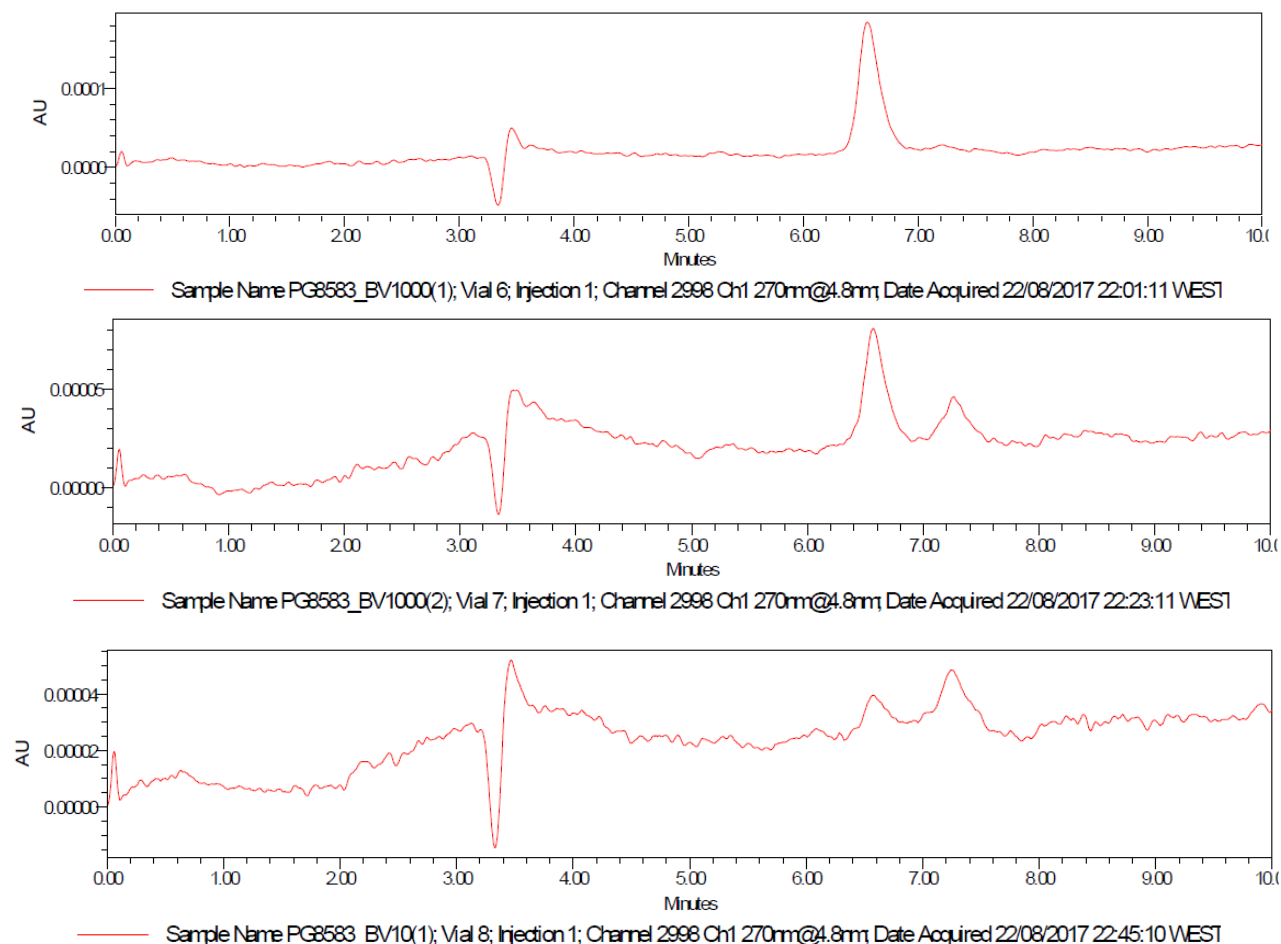
Tabela A2.4 – Valores de TC, IC e TOC obtidos do enxaguamento do material contaminado com Labwash (Dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele PG 8583 CD

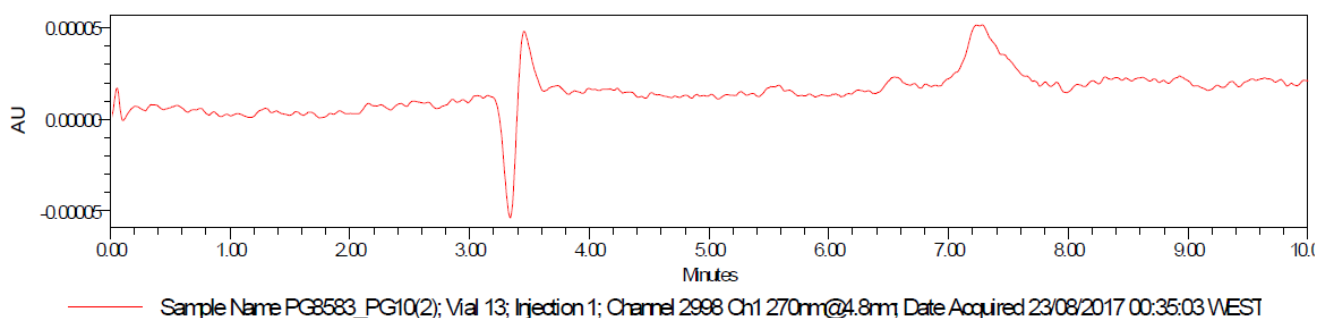
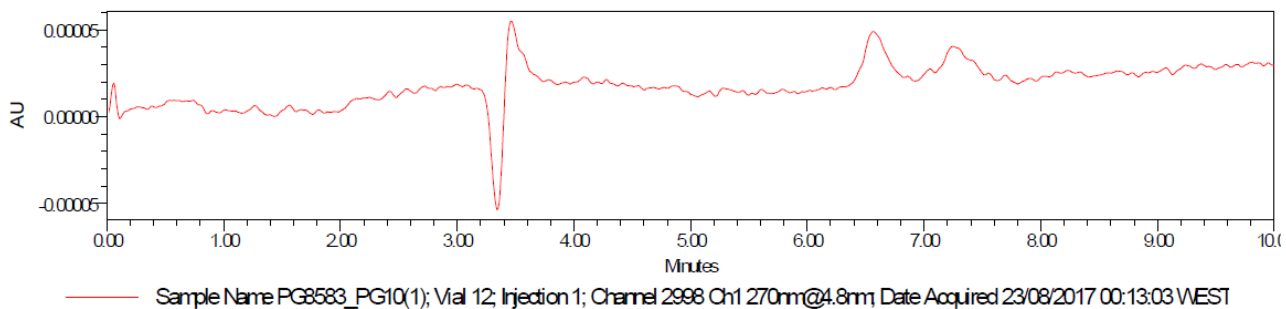
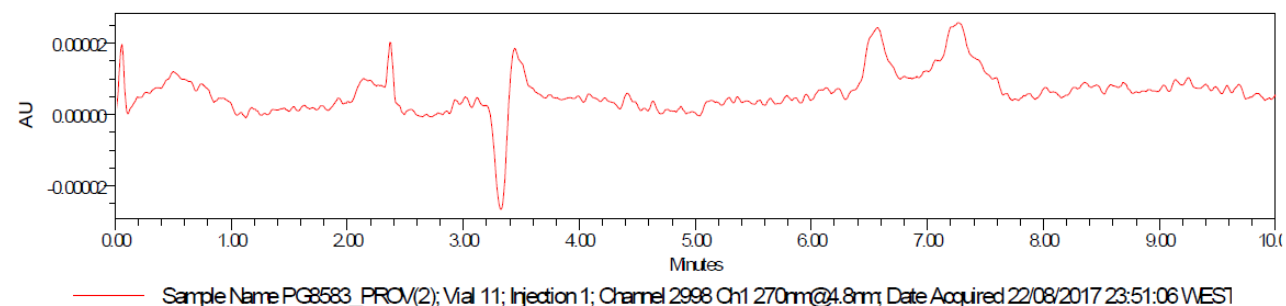
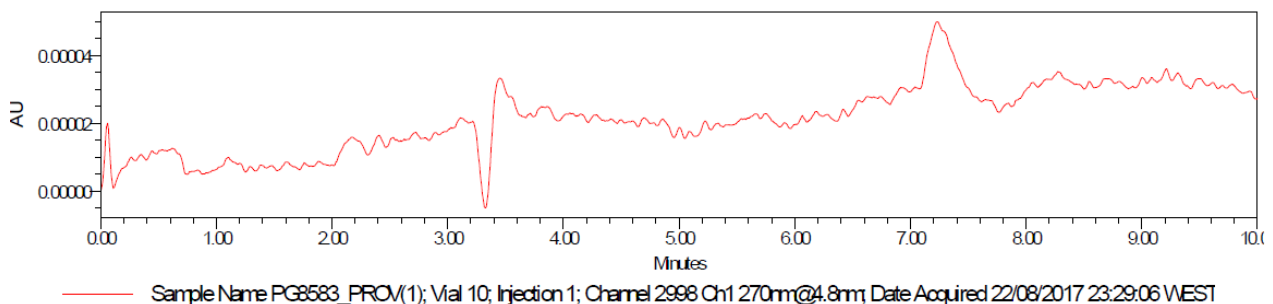
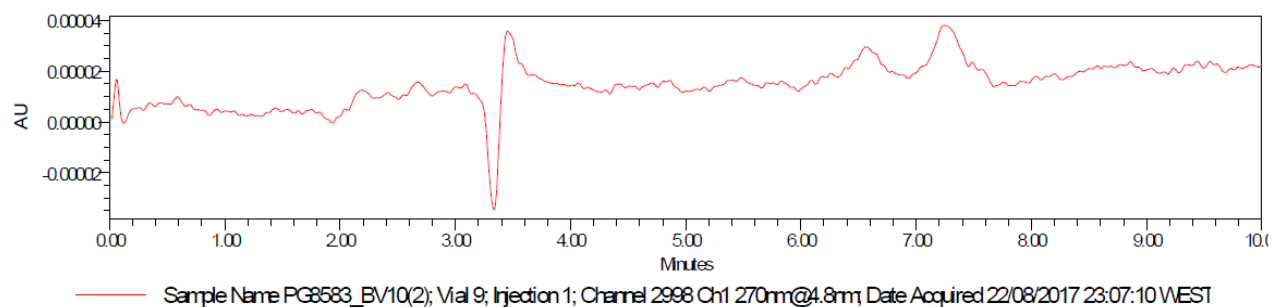
<b>Dia 1</b>				
	TC (ppb)	IC (ppb)	TOC (ppb)	TOC final (ppb)
<b>Branco</b>	171	157	14,5	
<b>Pipeta graduada 5 mL (1)</b>	430	316	113	98,5
<b>Pipeta graduada 5 mL (2)</b>	408	275	133	118,5
<b>Pipeta graduada 10 mL (1)</b>	451	324	127	112,5
<b>Pipeta graduada 10 mL (2)</b>	446	335	111	96,5
<b>Proveta 50 mL (1)</b>	416	302	114	99,5
<b>Proveta 50 mL (2)</b>	428	311	117	102,5
<b>Balão volumétrico 10 mL (1)</b>	407	313	94,8	80,3
<b>Balão volumétrico 10 mL (2)</b>	434	328	107	92,5
<b>Balão volumétrico 1000 mL (1)</b>	533	334	199	184,5
<b>Balão volumétrico 1000 mL (2)</b>	433	282	151	136,5

Tabela A2.5 - Valores de TC, IC e TOC obtidos do enxaguamento do material contaminado com Labwash (Dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele PG 8583 CD

Dia 2				
	TC (ppb)	IC (ppb)	TOC (ppb)	TOC final (ppb)
<b>Branco</b>	208	177	31	
<b>Pipeta graduada 5 mL (1)</b>	447	291	157	126
<b>Pipeta graduada 5 mL (2)</b>	468	318	150	119
<b>Pipeta graduada 10 mL (1)</b>	382	234	148	117
<b>Pipeta graduada 10 mL (2)</b>	420	268	152	121
<b>Proveta 50 mL (1)</b>	348	250	97,6	66,6
<b>Proveta 50 mL (2)</b>	335	236	99	68
<b>Balão volumétrico 10 mL (1)</b>	421	309	112	81
<b>Balão volumétrico 10 mL (2)</b>	400	285	115	84
<b>Balão volumétrico 1000 mL (1)</b>	399	245	153	122
<b>Balão volumétrico 1000 mL (2)</b>	402	253	149	118

Figura A2.1 - Cromatogramas correspondentes aos materiais ensaiados na contaminação por sulfametoxazol (Dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele PG 8583 CD





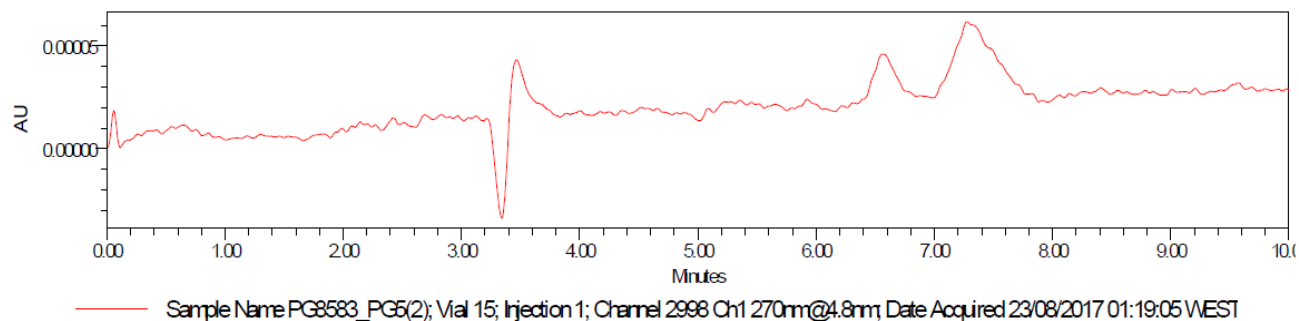
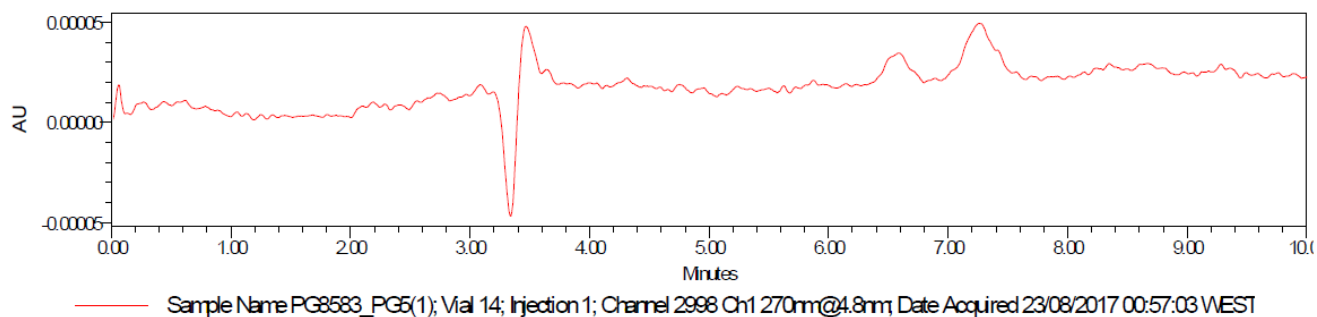
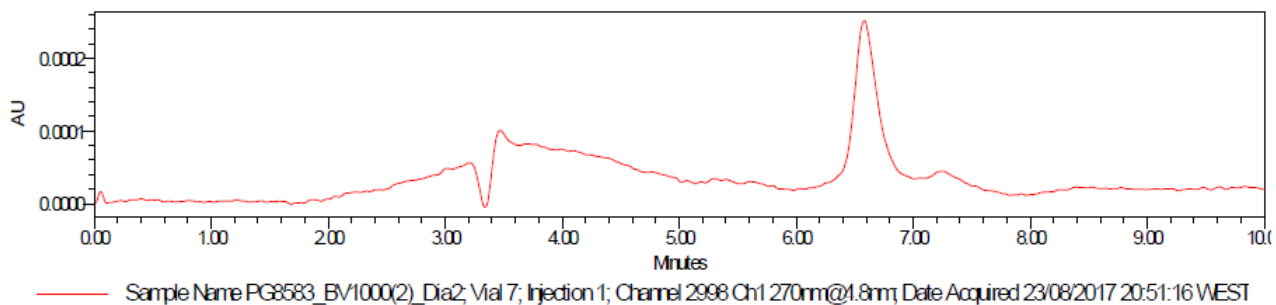
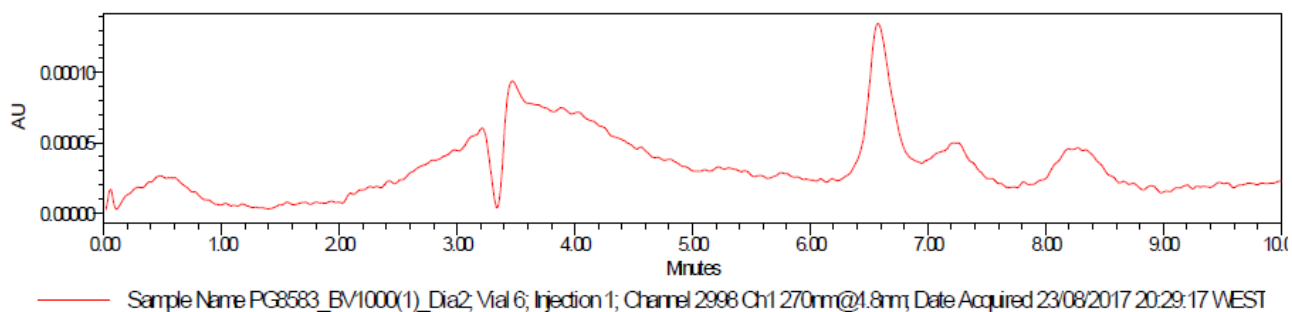
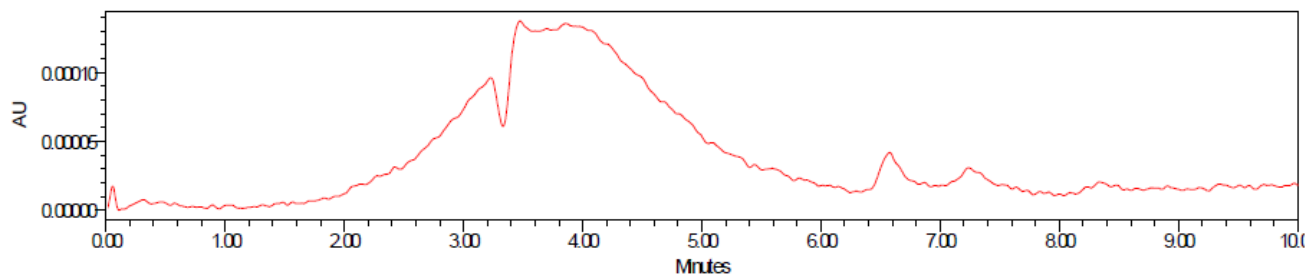
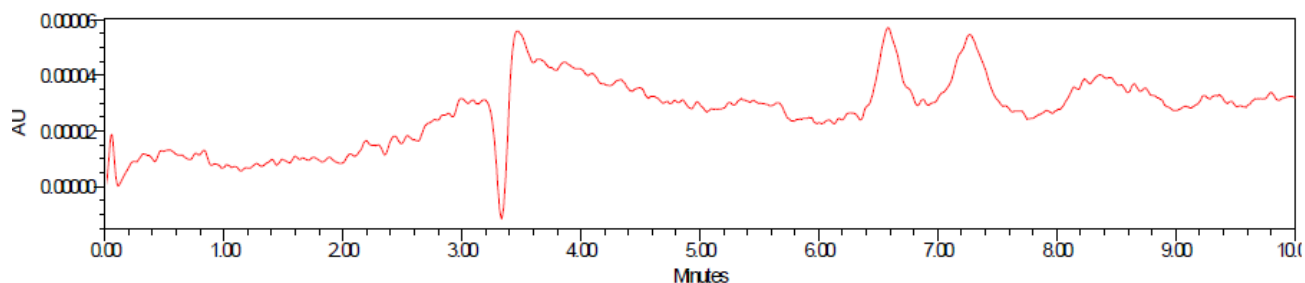


Figura A2.2 - Cromatogramas correspondentes aos materiais ensaiados na contaminação por sulfametoxazol (Dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele PG 8583 CD

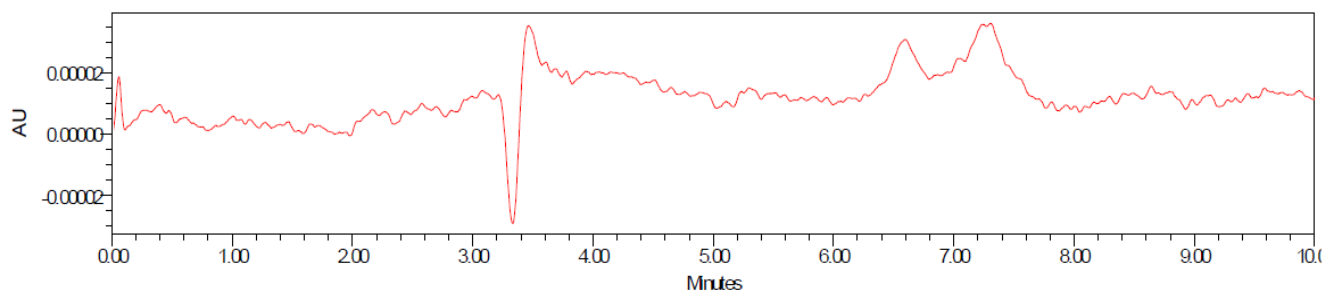




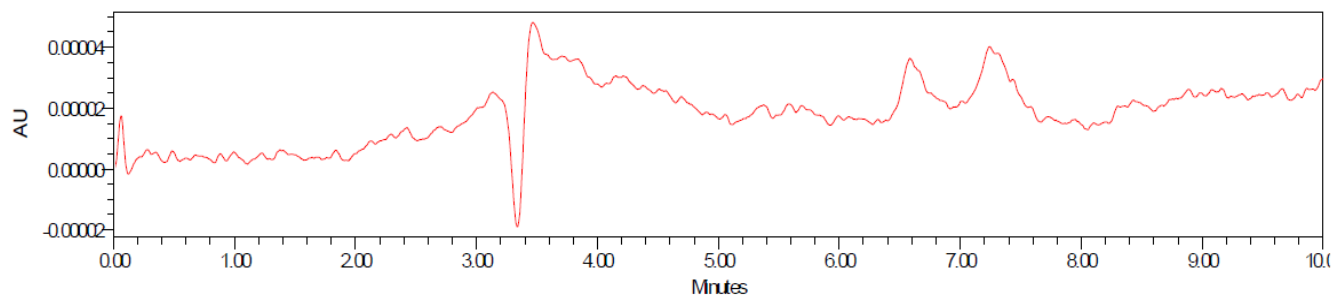
— Sample Name PG8583\_BV10(1)\_Dia2; Vial 8; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 23/08/2017 21:13:14 WEST



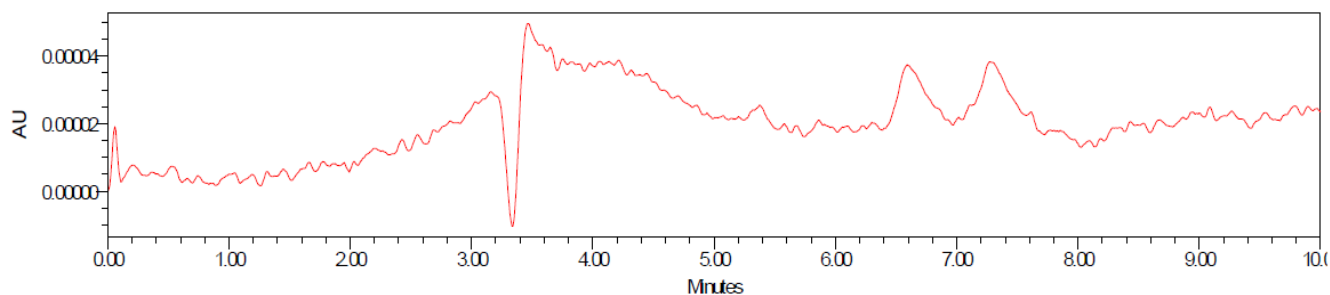
— Sample Name PG8583\_BV10(2)\_Dia2; Vial 9; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 23/08/2017 21:35:13 WEST



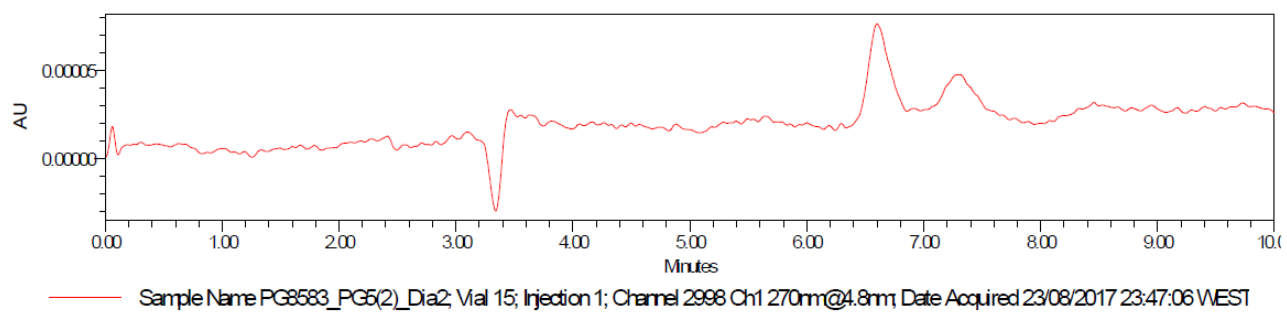
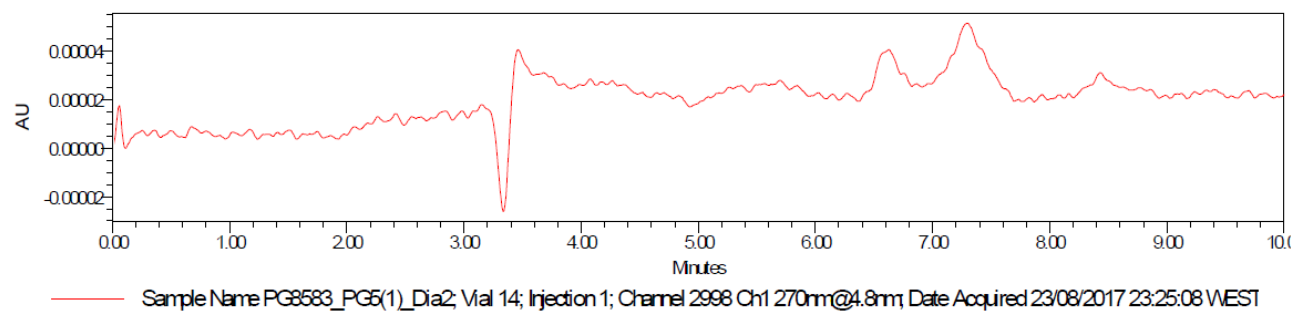
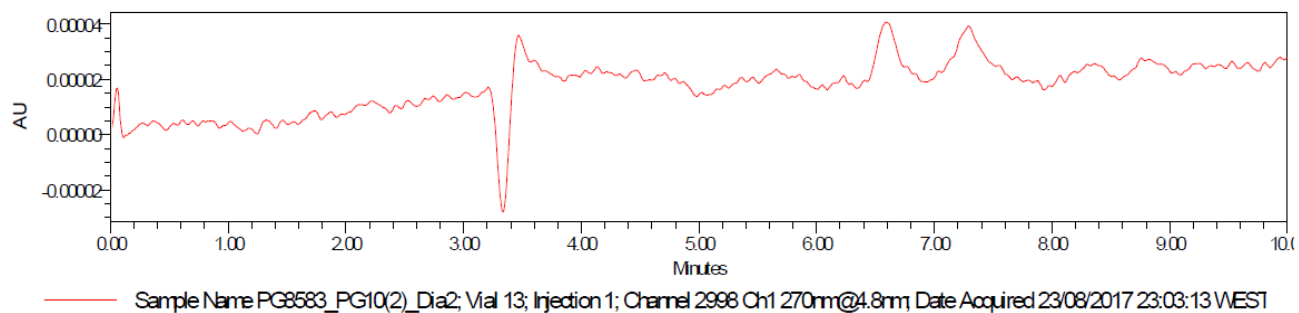
— Sample Name PG8583\_PROV(1)\_Dia2; Vial 10; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 23/08/2017 21:57:13 WEST



— Sample Name PG8583\_PROV(2)\_Dia2; Vial 11; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 23/08/2017 22:19:13 WEST



— Sample Name PG8583\_PG10(1)\_Dia2; Vial 12; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 23/08/2017 22:41:13 WEST



**A3 – Resultados obtidos do enxaguamento de material submetido à lavagem na máquina Miele G7733**

Tabela A3.1 - Valores de TC, IC e TOC obtidos do enxaguamento de material por contaminar e submetido à lavagem na máquina Miele G7733

	<b>TC (ppb)</b>	<b>IC (ppb)</b>	<b>TOC (ppb)</b>	<b>TOC experimental (ppb)</b>
<b>Branco</b>	167	148	19,2	
<b>Tubo de ensaio 30 mL (1)</b>	445	230	215	195,8
<b>Tubo de ensaio 30 mL (2)</b>	416	240	176	156,8
<b>Tubo de ensaio 30 mL (3)</b>	441	250	191	171,8
<b>Tubo de ensaio 30 mL (4)</b>	479	251	228	208,8
<b>Tubo de ensaio 30 mL (5)</b>	487	274	213	193,8
<b>Tubo de ensaio 30 mL (6)</b>	527	265	262	242,8
<b>Tubo de ensaio 30 mL (7)</b>	475	283	192	172,8
<b>Tubo de ensaio 30 mL (8)</b>	448	276	172	152,8
<b>Tubo de ensaio 30 mL (9)</b>	484	288	196	176,8
<b>Tubo de ensaio 30 mL (10)</b>	591	309	282	262,8
<b>Almofariz e pilão (1)</b>	555	294	261	241,8
<b>Almofariz e pilão (2)</b>	655	368	288	268,8
<b>Copo filtração 300 mL (1)</b>	459	238	220	200,8
<b>Copo filtração 300 mL (2)</b>	562	280	282	262,8
<b>Copo polipropileno 100 mL (1)</b>	447	260	187	167,8
<b>Copo polipropileno 100 mL (2)</b>	446	259	187	167,8
<b>Copo polipropileno 250 mL (1)</b>	399	246	152	132,8
<b>Copo polipropileno 250 mL (2)</b>	346	230	115	95,8
<b>Frasco 100 mL (1)</b>	352	265	87	67,8
<b>Frasco 100 mL (2)</b>	319	248	70	50,8
<b>Frasco 1000 mL (1)</b>	475	297	178	158,8
<b>Frasco 1000 mL (2)</b>	535	329	206	186,8
<b>Frasco 2000 mL (1)</b>	668	343	325	305,8
<b>Frasco 2000 mL (2)</b>	873	360	513	493,8
<b>Espátula (1)</b>	475	305	170	150,8
<b>Espátula (2)</b>	500	331	169	149,8
<b>Pinça (1)</b>	633	360	273	253,8
<b>Pinça (2)</b>	574	344	230	210,8

Tabela A3.2 - Valores de TC, IC e TOC obtidos do enxaguamento de material contaminado com Labwash (Dia 1) e submetido à lavagem na máquina Miele G7733

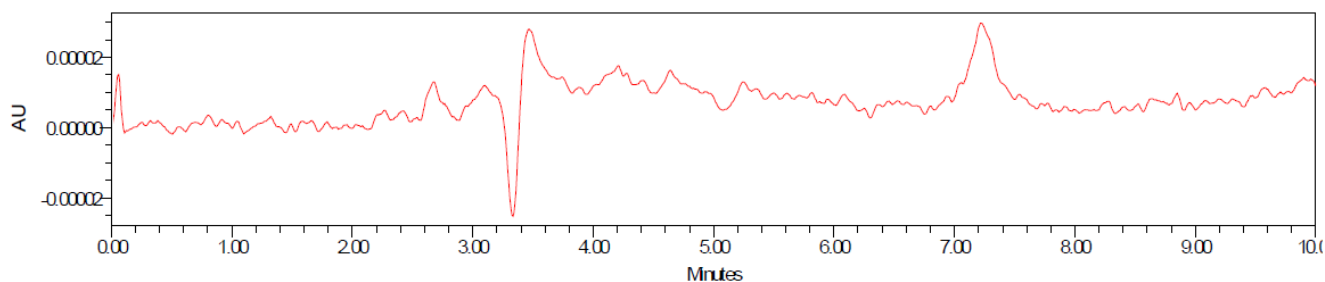
<b>Dia 1</b>				
	<b>TC (ppb)</b>	<b>IC (ppb)</b>	<b>TOC (ppb)</b>	<b>TOC final (ppb)</b>
<b>Branco</b>	222	193	29,3	
<b>Tubo de ensaio 30 mL (1)</b>	460	293	168	138,7
<b>Tubo de ensaio 30 mL (2)</b>	482	288	194	164,7
<b>Tubo de ensaio 30 mL (3)</b>	545	332	214	184,7
<b>Tubo de ensaio 30 mL (4)</b>	661	333	328	298,7
<b>Tubo de ensaio 30 mL (5)</b>	573	343	231	201,7
<b>Tubo de ensaio 30 mL (6)</b>	563	325	238	208,7
<b>Tubo de ensaio 30 mL (7)</b>	523	333	191	161,7
<b>Tubo de ensaio 30 mL (8)</b>	517	334	183	153,7
<b>Tubo de ensaio 30 mL (9)</b>	506	347	159	129,7
<b>Tubo de ensaio 30 mL (10)</b>	513	328	185	155,7
<b>Almofariz e pilão (1)</b>	862	416	446	416,7
<b>Almofariz e pilão (2)</b>	721	364	357	327,7
<b>Copo filtração 300 mL (1)</b>	718	384	335	305,7
<b>Copo filtração 300 mL (2)</b>	621	358	262	232,7
<b>Copo polipropileno 100 mL (1)</b>	530	281	249	219,7
<b>Copo polipropileno 100 mL (2)</b>	586	286	300	270,7
<b>Copo polipropileno 250 mL (1)</b>	770	316	454	424,7
<b>Copo polipropileno 250 mL (2)</b>	733	305	427	397,7
<b>Frasco 100 mL (1)</b>	452	313	139	109,7
<b>Frasco 100 mL (2)</b>	421	291	130	100,7
<b>Frasco 1000 mL (1)</b>	628	337	291	261,7
<b>Frasco 1000 mL (2)</b>	675	347	328	298,7
<b>Frasco 2000 mL (1)</b>	728	299	429	399,7
<b>Frasco 2000 mL (2)</b>	621	290	331	301,7
<b>Espátula (1)</b>	458	317	141	111,7
<b>Espátula (2)</b>	460	318	142	112,7
<b>Pinça (1)</b>	553	357	196	166,7
<b>Pinça (2)</b>	538	345	194	164,7



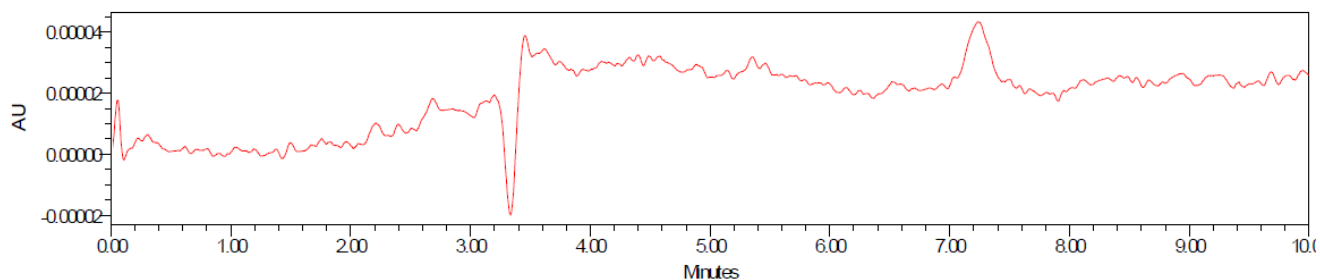
Tabela A3.3 - Valores de TC, IC e TOC obtidos do enxaguamento de material contaminado com Labwash (Dia 2) e submetido à lavagem na máquina Miele G7733

<b>Dia 2</b>				
	<b>TC (ppb)</b>	<b>IC (ppb)</b>	<b>TOC (ppb)</b>	<b>TOC final (ppb)</b>
<b>Branco</b>	197	172	24,6	
<b>Tubo de ensaio 30 mL (1)</b>	540	366	174	149,4
<b>Tubo de ensaio 30 mL (2)</b>	380	279	101	76,4
<b>Tubo de ensaio 30 mL (3)</b>	430	319	112	87,4
<b>Tubo de ensaio 30 mL (4)</b>	426	307	119	94,4
<b>Tubo de ensaio 30 mL (5)</b>	427	332	95,3	70,7
<b>Tubo de ensaio 30 mL (6)</b>	443	321	122	97,4
<b>Tubo de ensaio 30 mL (7)</b>	487	317	170	145,4
<b>Tubo de ensaio 30 mL (8)</b>	420	298	121	96,4
<b>Tubo de ensaio 30 mL (9)</b>	447	306	142	117,4
<b>Tubo de ensaio 30 mL (10)</b>	510	342	169	144,4
<b>Almofariz e pilão (1)</b>	540	310	230	205,4
<b>Almofariz e pilão (2)</b>	557	312	245	220,4
<b>Copo filtração 300 mL (1)</b>	526	246	279	254,4
<b>Copo filtração 300 mL (2)</b>	559	297	262	237,4
<b>Copo polipropileno 100 mL (1)</b>	367	280	87,6	63,0
<b>Copo polipropileno 100 mL (2)</b>	381	280	101	76,4
<b>Copo polipropileno 250 mL (1)</b>	520	271	250	225,4
<b>Copo polipropileno 250 mL (2)</b>	532	302	230	205,4
<b>Frasco 100 mL (1)</b>	414	280	134	109,4
<b>Frasco 100 mL (2)</b>	367	270	97,3	72,7
<b>Frasco 1000 mL (1)</b>	488	309	179	154,4
<b>Frasco 1000 mL (2)</b>	512	323	189	164,4
<b>Frasco 2000 mL (1)</b>	736	311	424	399,4
<b>Frasco 2000 mL (2)</b>	600	284	316	291,4
<b>Espátula (1)</b>	415	267	148	123,4
<b>Espátula (2)</b>	468	315	153	128,4
<b>Pinça (1)</b>	471	308	163	138,4
<b>Pinça (2)</b>	511	336	176	151,4

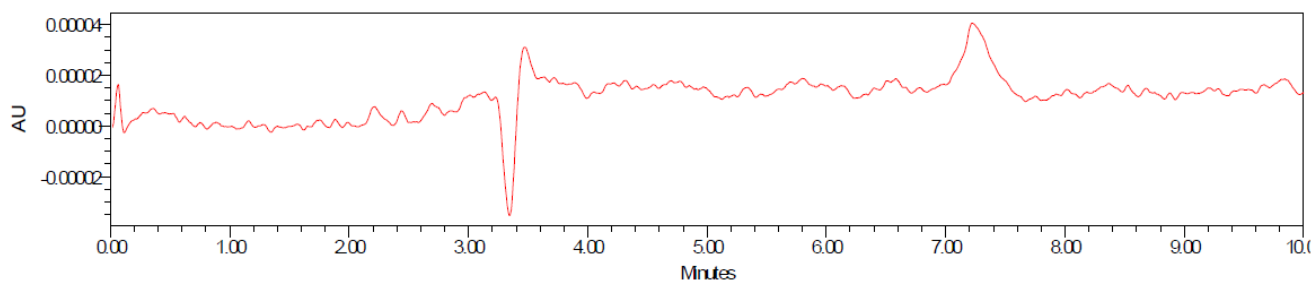
Figura A3.1 - Cromatogramas correspondentes aos outros materiais ensaiados na contaminação por sulfametoxazol e submetido à lavagem na máquina Miele G7733 (Dia 1)



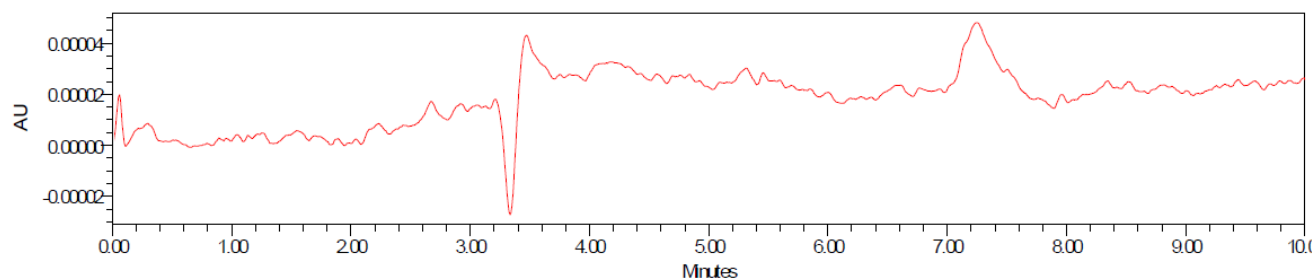
— Sample Name T1\_1; Vial 5; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 24/08/2017 21:18:16 WEST



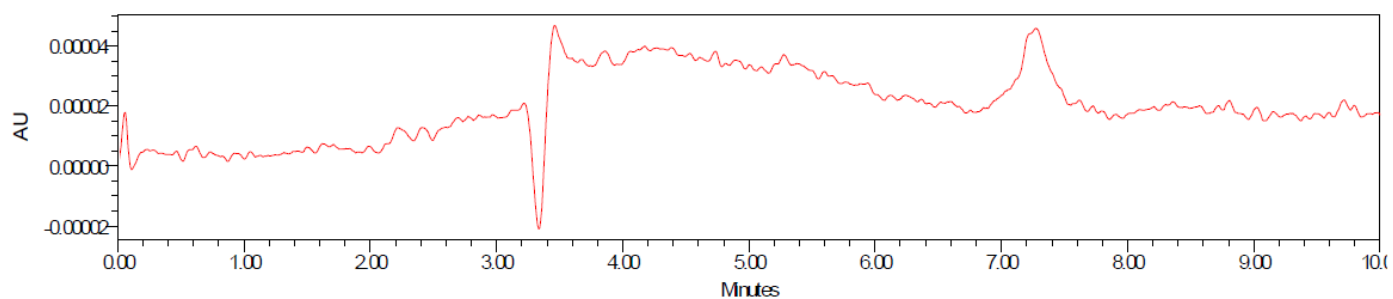
— Sample Name T2\_1; Vial 6; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 24/08/2017 21:40:16 WEST



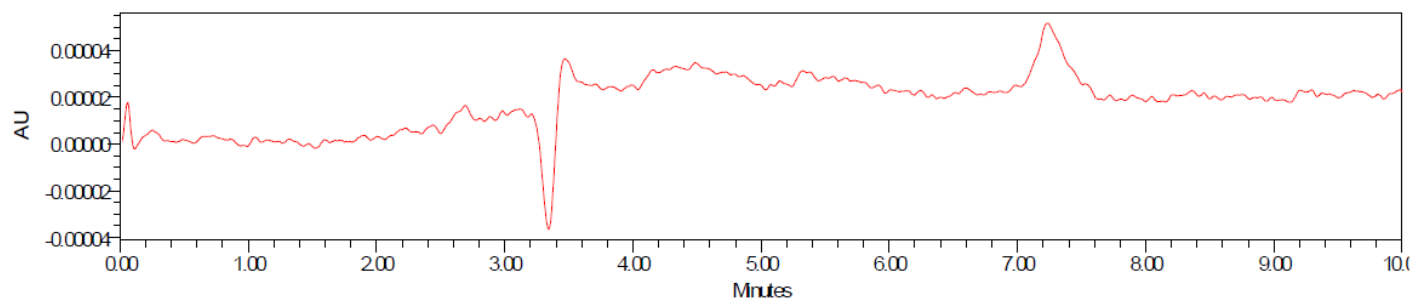
— Sample Name T4\_1; Vial 8; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 24/08/2017 22:24:11 WEST



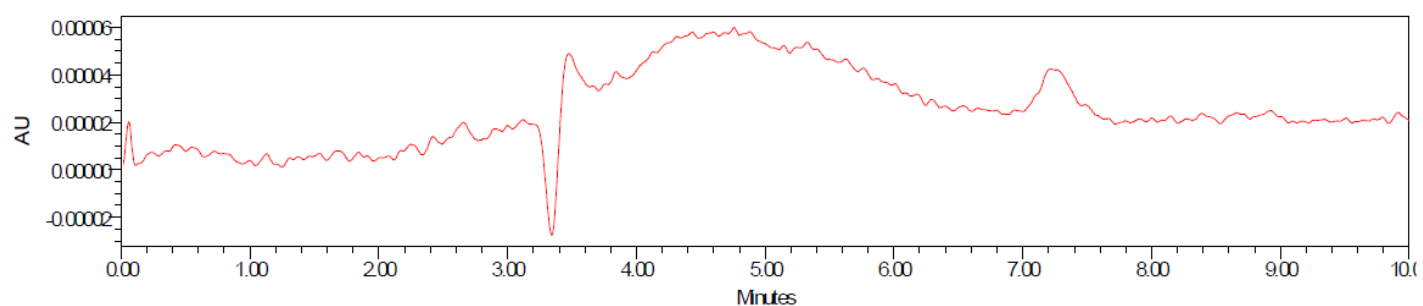
— Sample Name T5\_1; Vial 9; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 24/08/2017 22:46:08 WEST



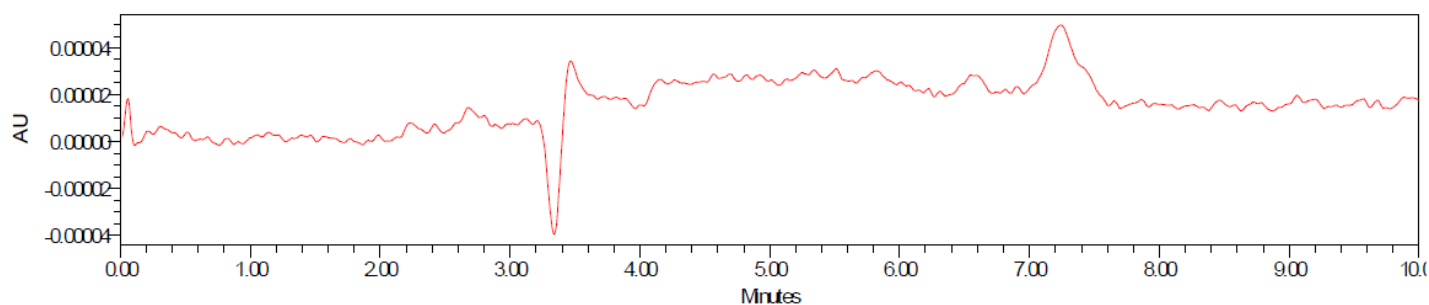
— Sample Name T6\_1; Vial 10; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8mm; Date Acquired 24/08/2017 23:08:08 WEST



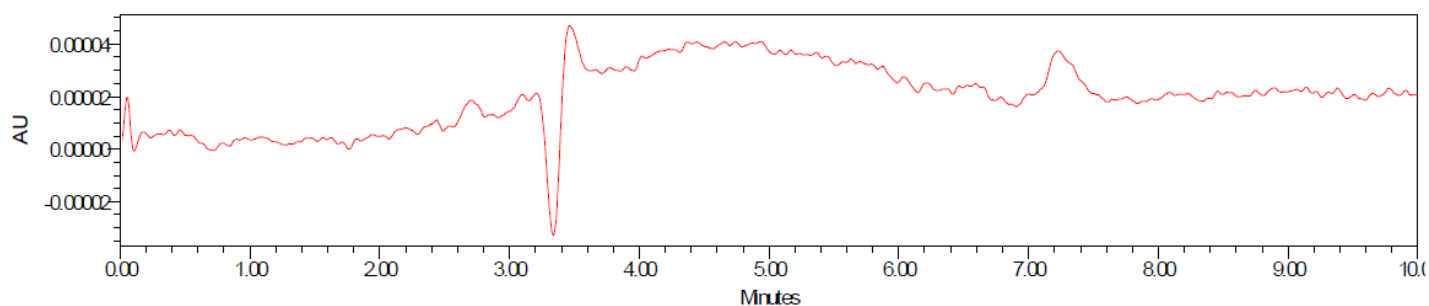
— Sample Name T7\_1; Vial 11; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8mm; Date Acquired 24/08/2017 23:30:05 WEST



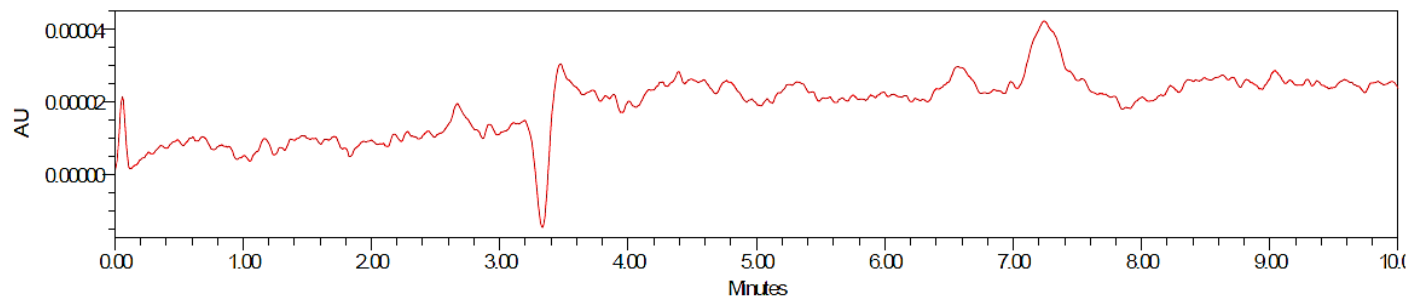
— Sample Name T8\_1; Vial 12; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8mm; Date Acquired 24/08/2017 23:52:00 WEST



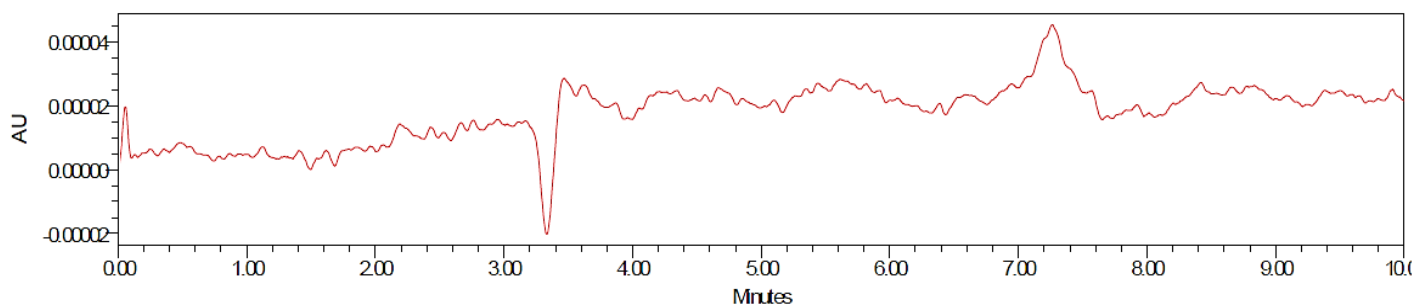
— Sample Name T9\_1; Vial 13; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8mm; Date Acquired 25/08/2017 00:13:56 WEST



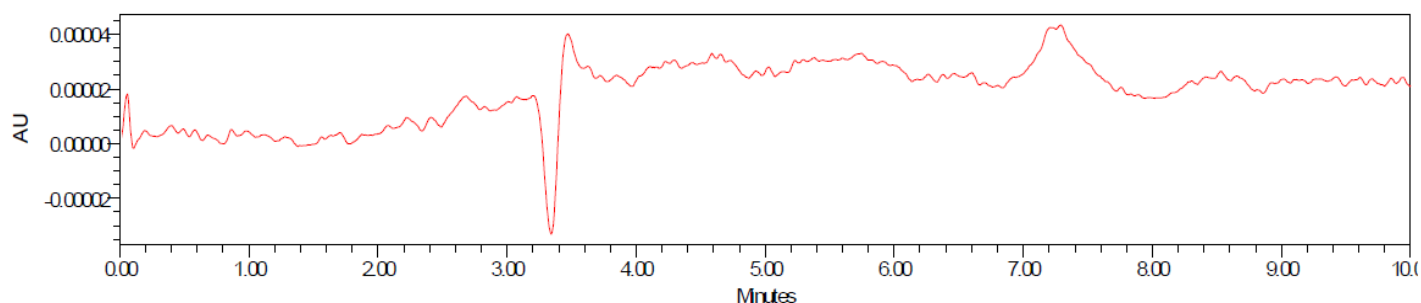
— Sample Name T10\_1; Vial 14; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8mm; Date Acquired 25/08/2017 00:35:52 WEST



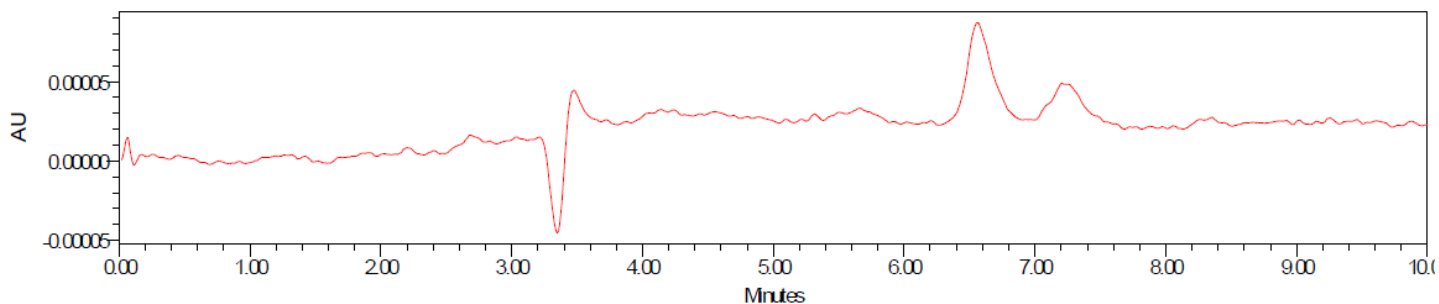
— Sample Name PP100(1)\_1; Vial 15; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 25/08/2017 00:57:47 WEST



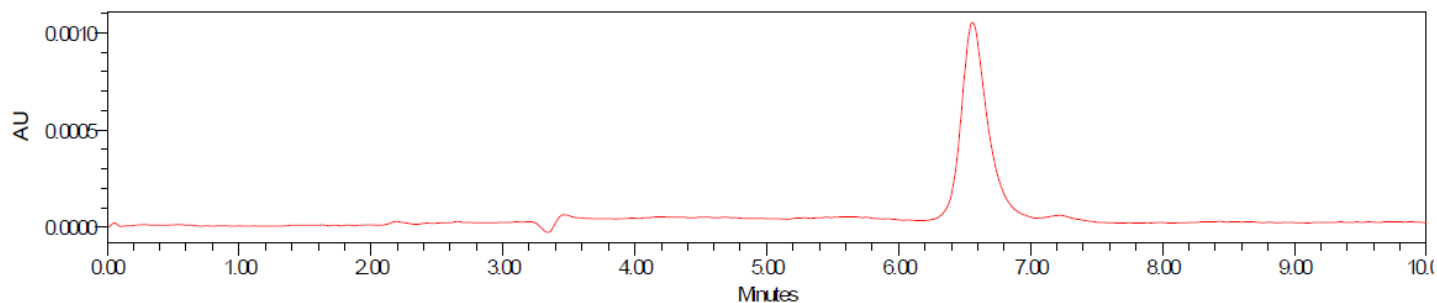
— Sample Name PP100(2)\_1; Vial 16; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 25/08/2017 01:19:43 WEST



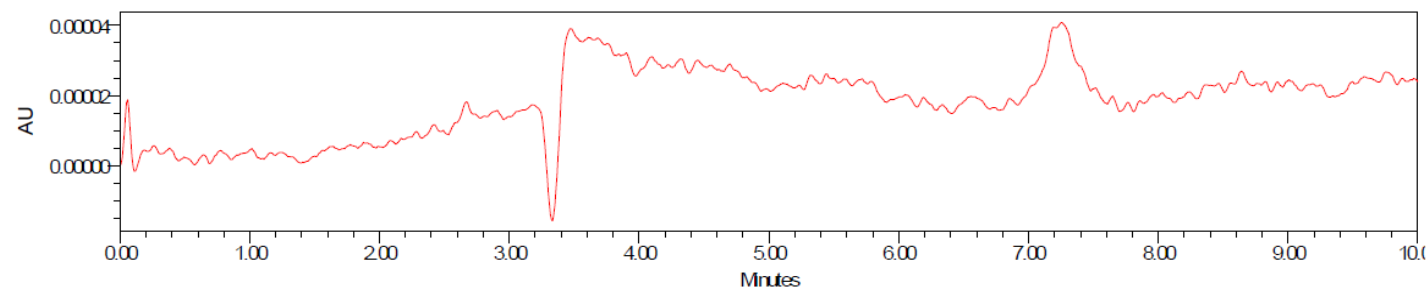
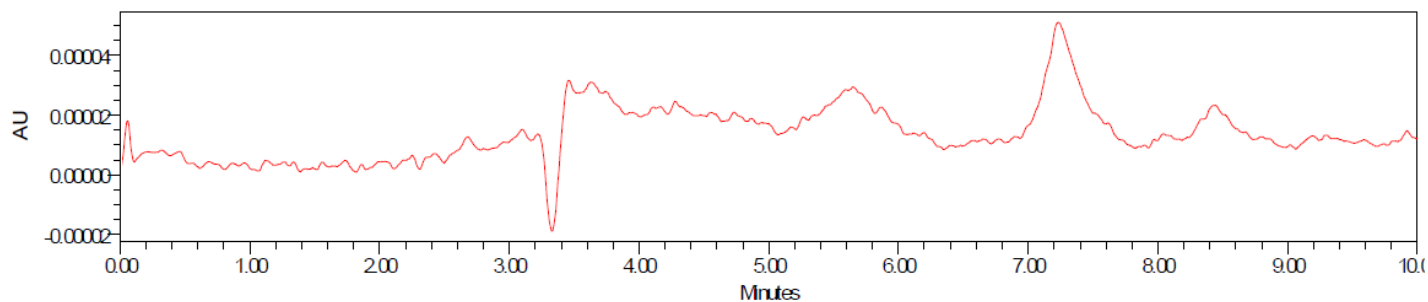
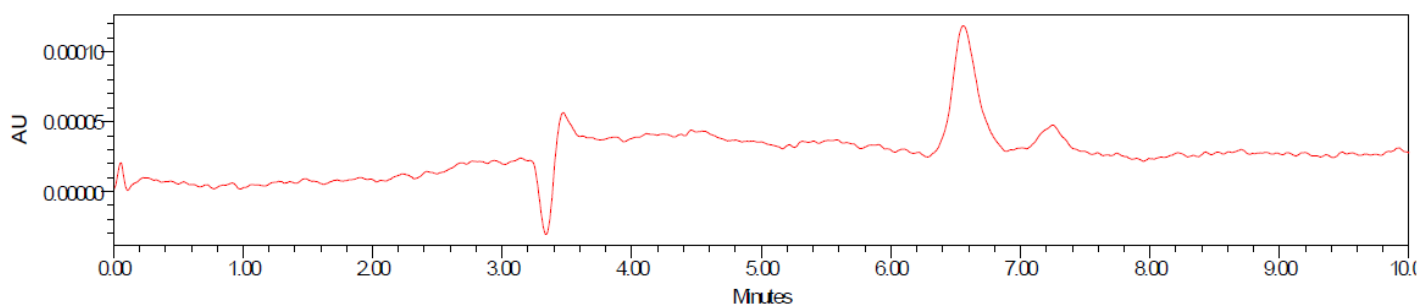
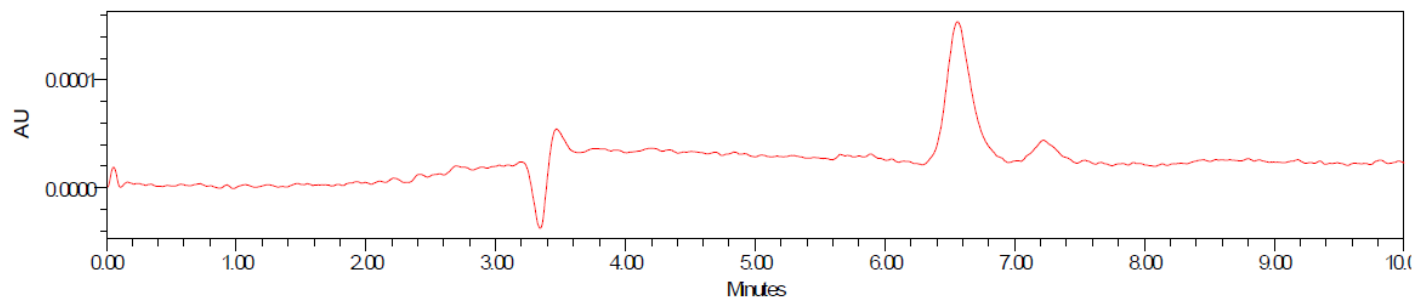
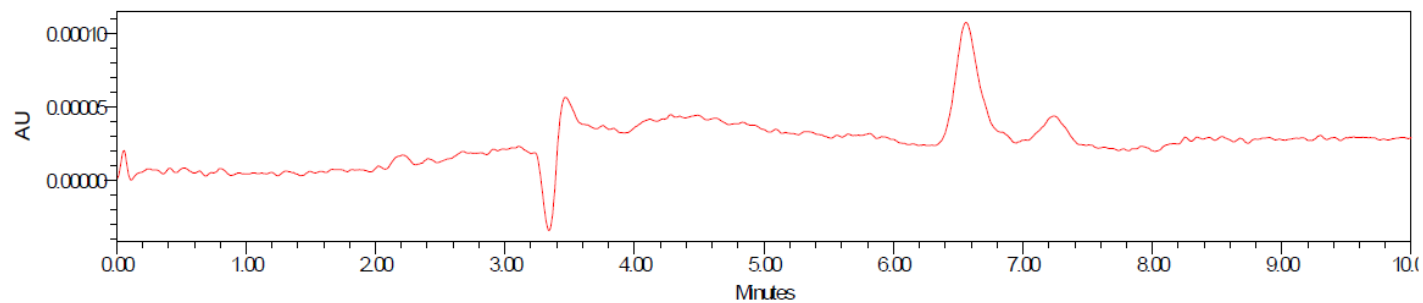
— Sample Name PP250(1)\_1; Vial 17; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 25/08/2017 01:41:39 WEST

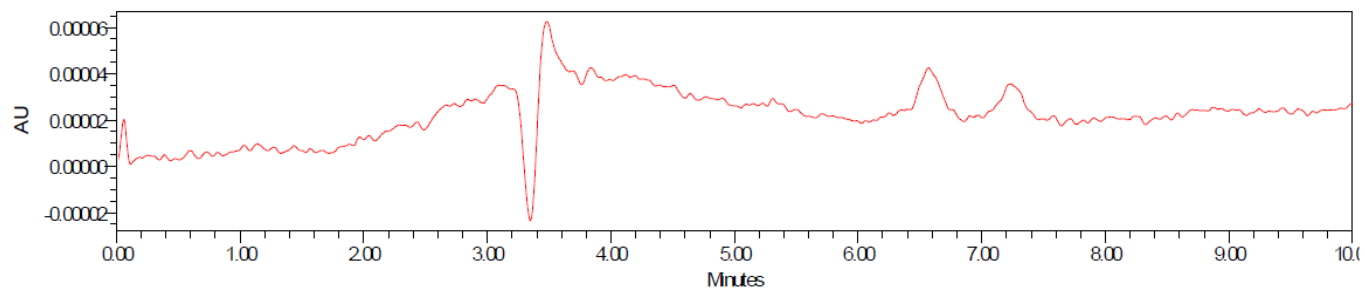


— Sample Name PP250(2)\_1; Vial 18; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 25/08/2017 02:03:39 WEST

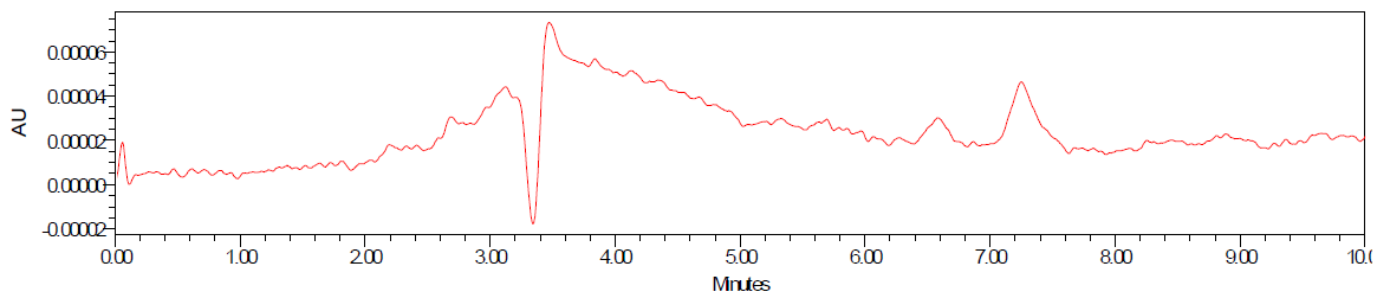


— Sample Name Copofiltracao(1)\_1; Vial 19; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 25/08/2017 02:25:39 WEST

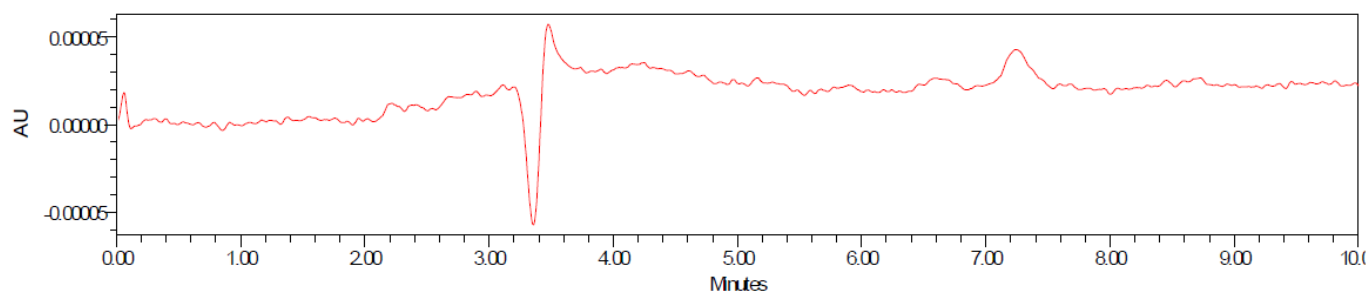




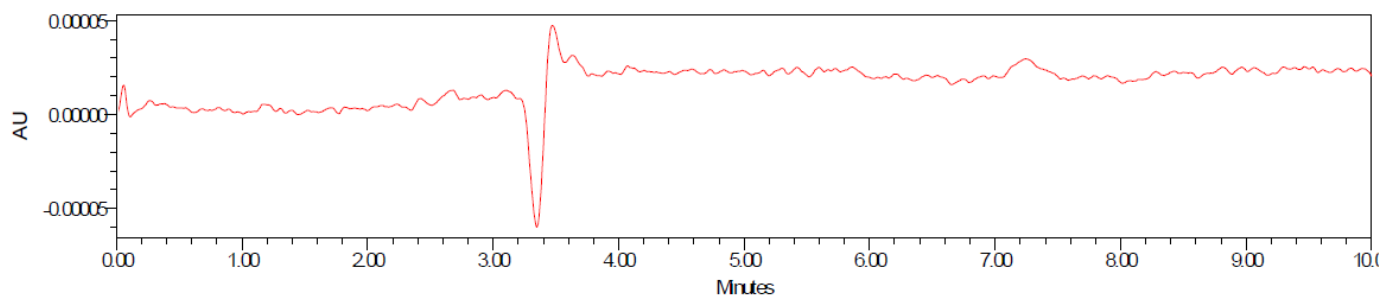
Sample Name Fr1000(1)\_1; Vial 25; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8mm; Date Acquired 25/08/2017 04:38:03 WEST



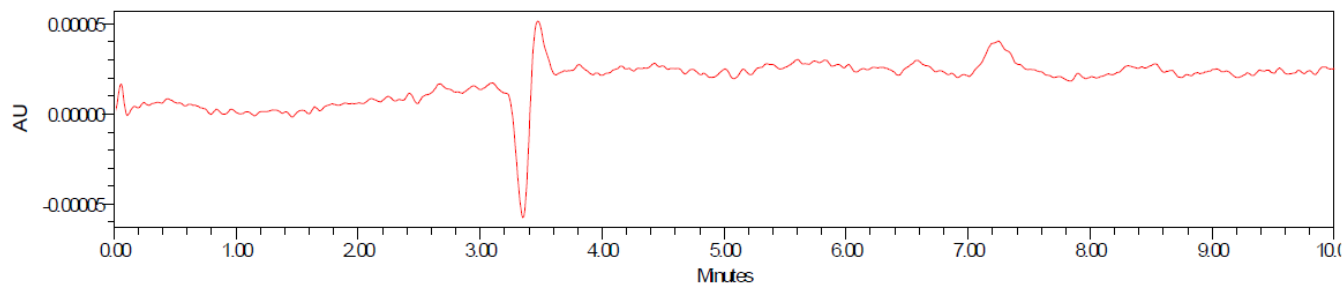
Sample Name Fr1000(2)\_1; Vial 26; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8mm; Date Acquired 25/08/2017 05:00:04 WEST



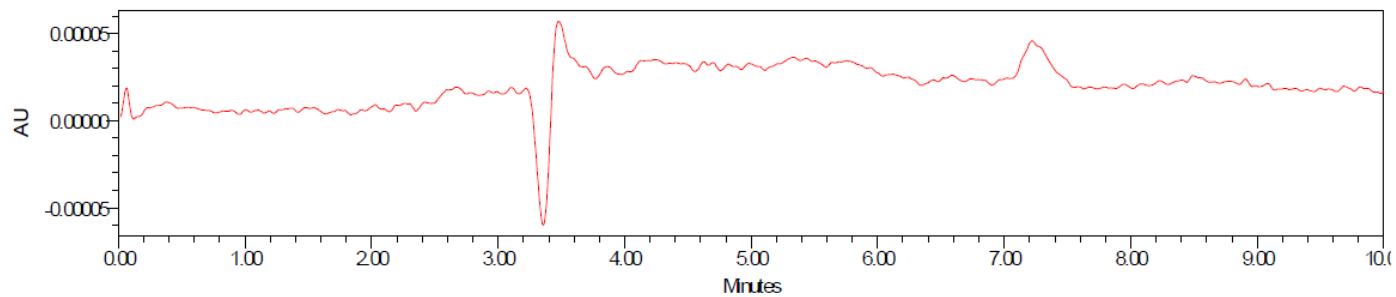
Sample Name Fr2000(1)\_1; Vial 27; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8mm; Date Acquired 25/08/2017 05:21:57 WEST



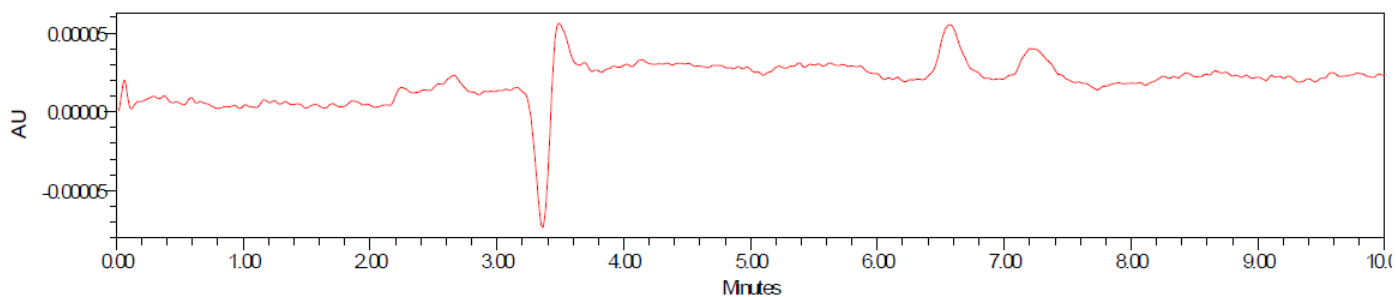
Sample Name Fr2000(2)\_1; Vial 28; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8mm; Date Acquired 25/08/2017 05:43:55 WEST



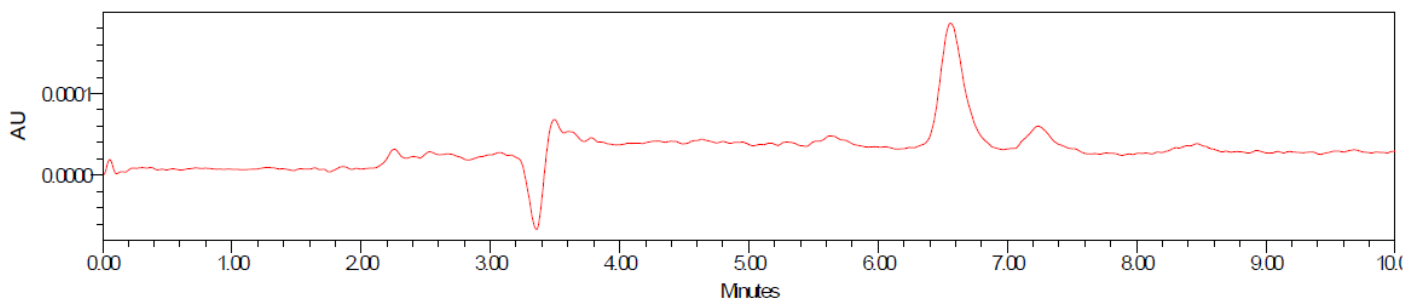
Sample Name Espatula(1)\_1; Vial 29; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8mm; Date Acquired 25/08/2017 06:05:51 WEST



— Sample Name Espatula(2)\_1; Vial 30; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 25/08/2017 06:27:50 WEST

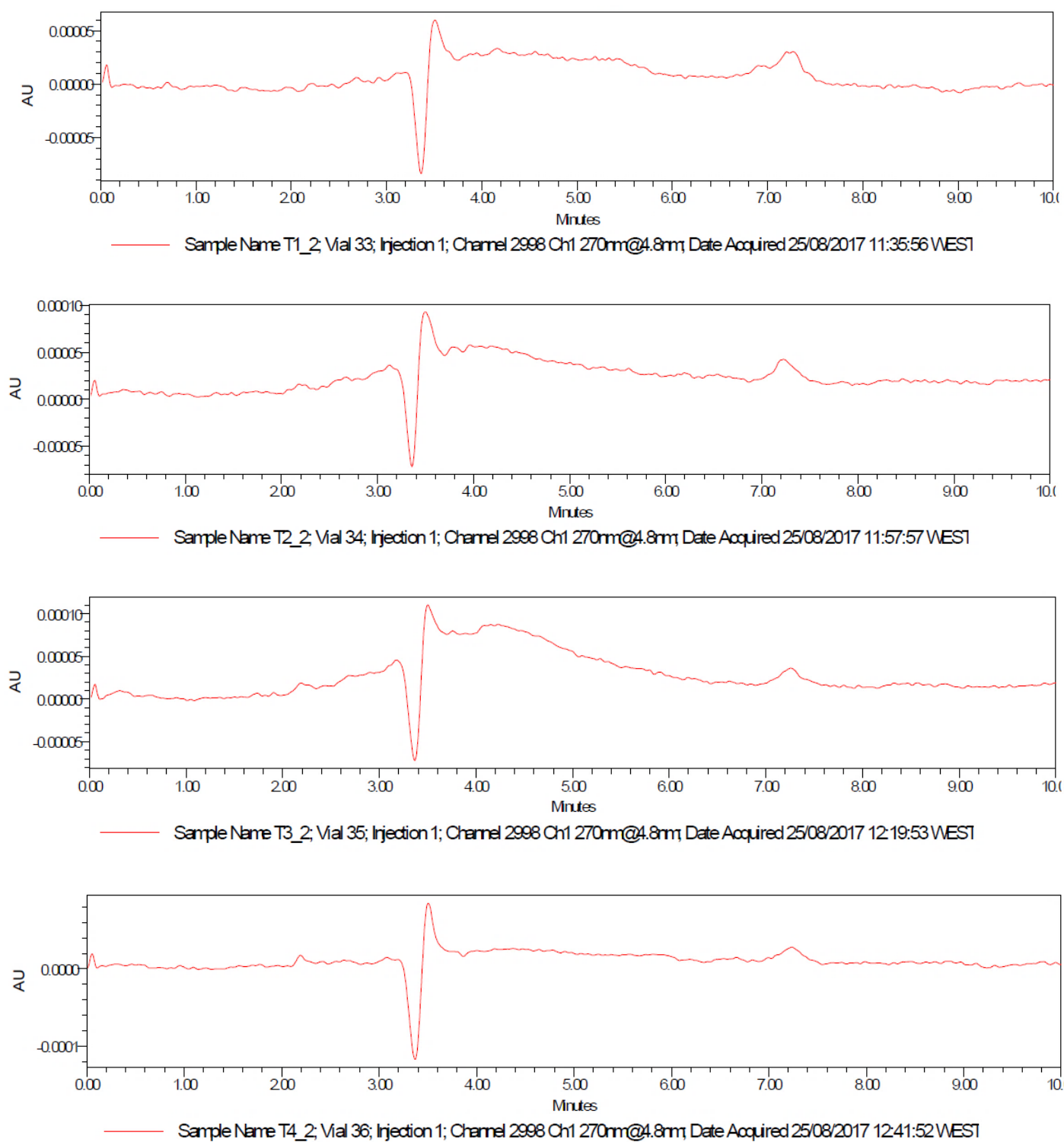


— Sample Name Pinça(1)\_1; Vial 31; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 25/08/2017 06:49:54 WEST

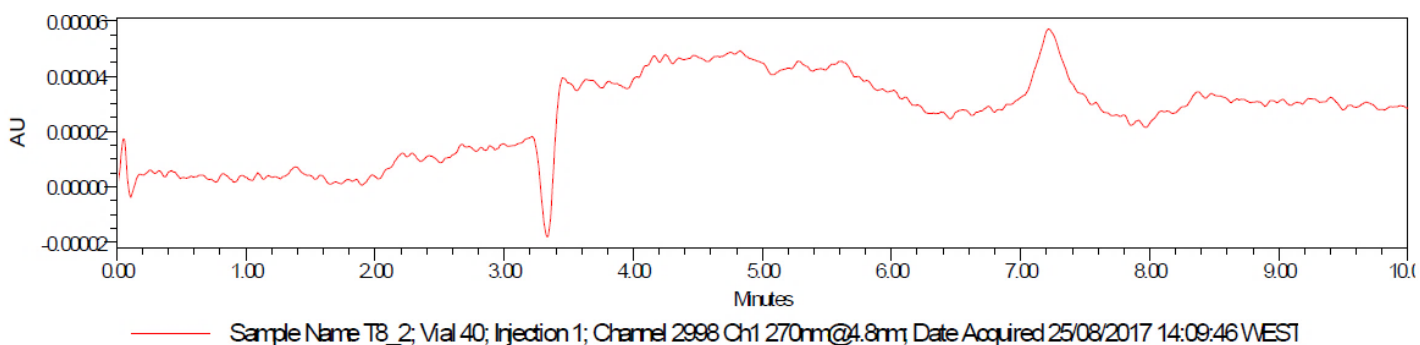
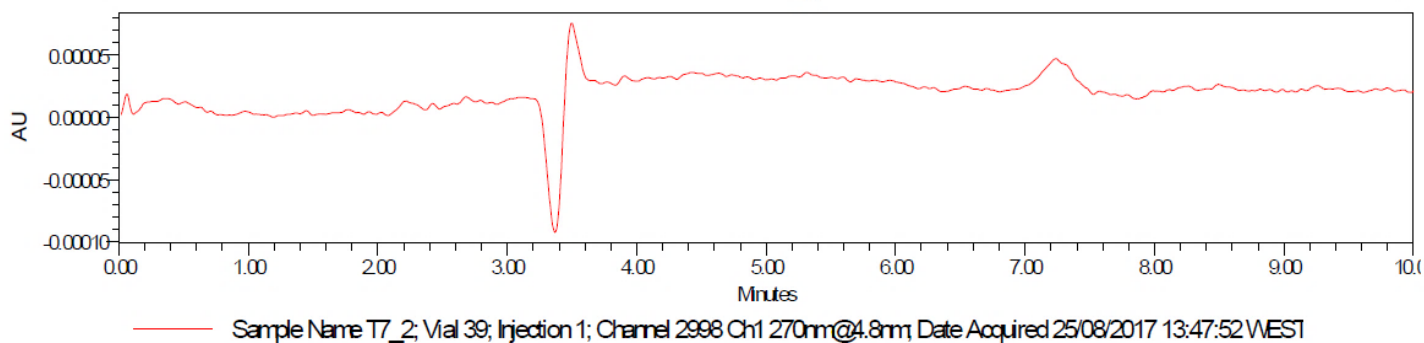
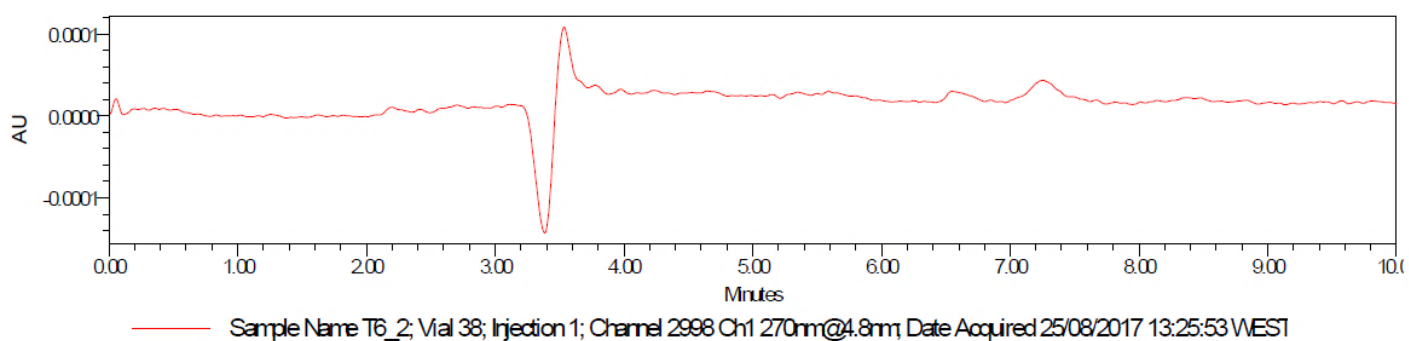
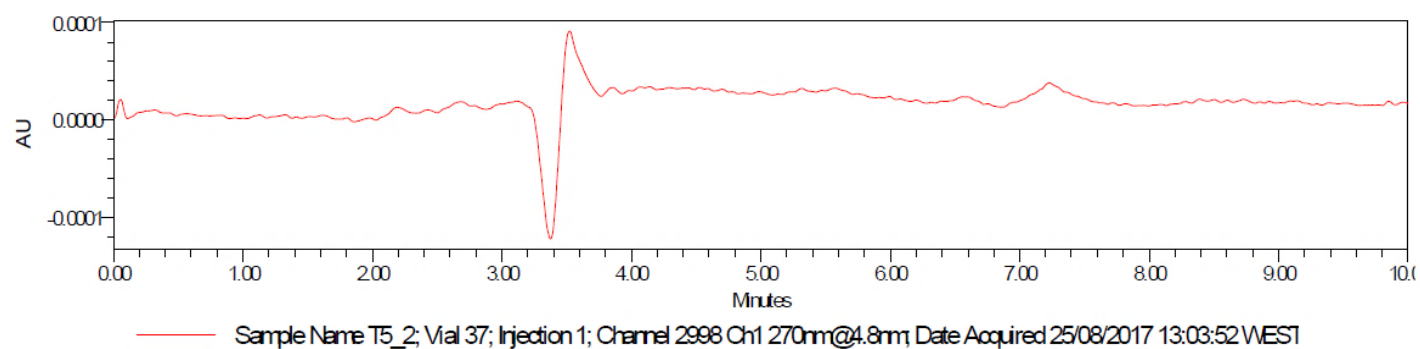


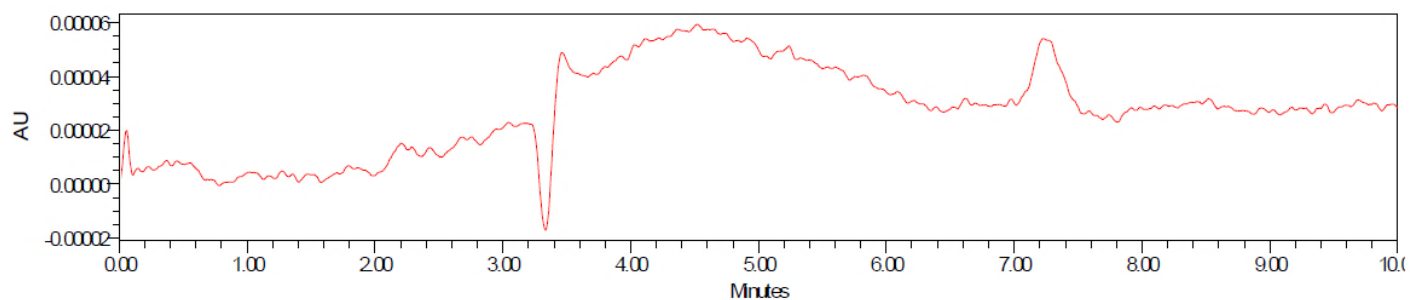
— Sample Name Pinça(2)\_1; Vial 32; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 25/08/2017 07:11:53 WEST

Figura A3.2 - Cromatogramas correspondentes aos outros materiais ensaiados na contaminação por sulfametoxazol e submetido à lavagem na máquina Miele G7733 (Dia 2)

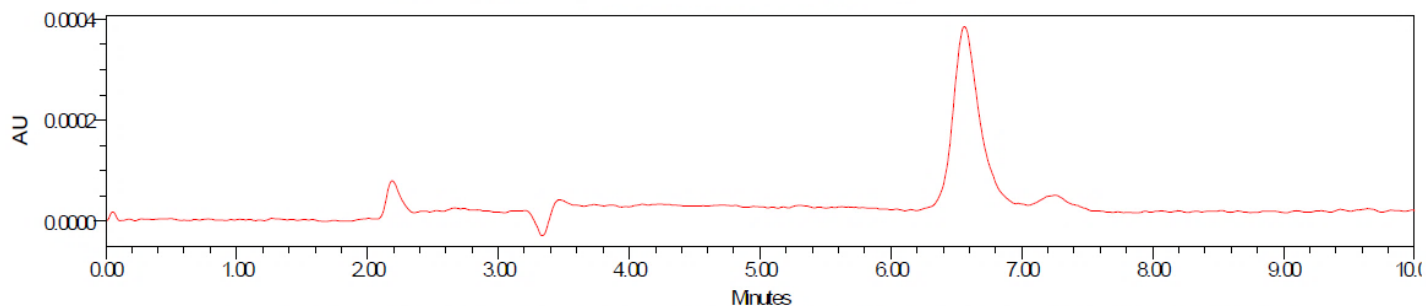




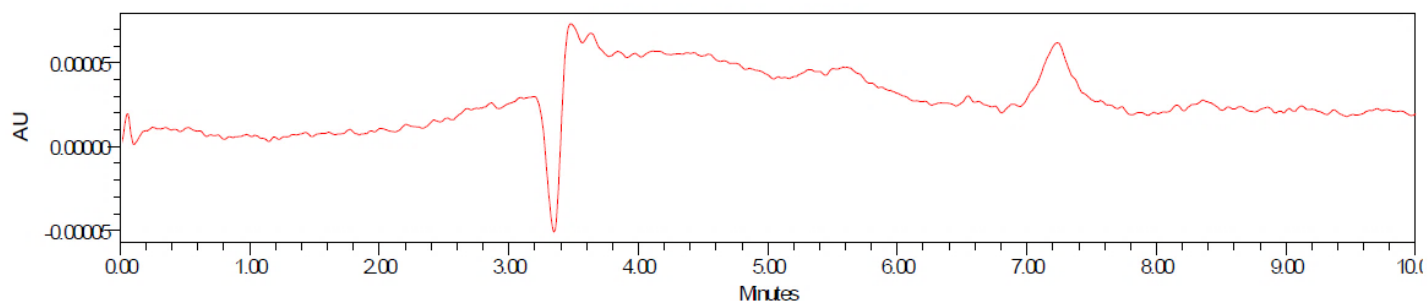




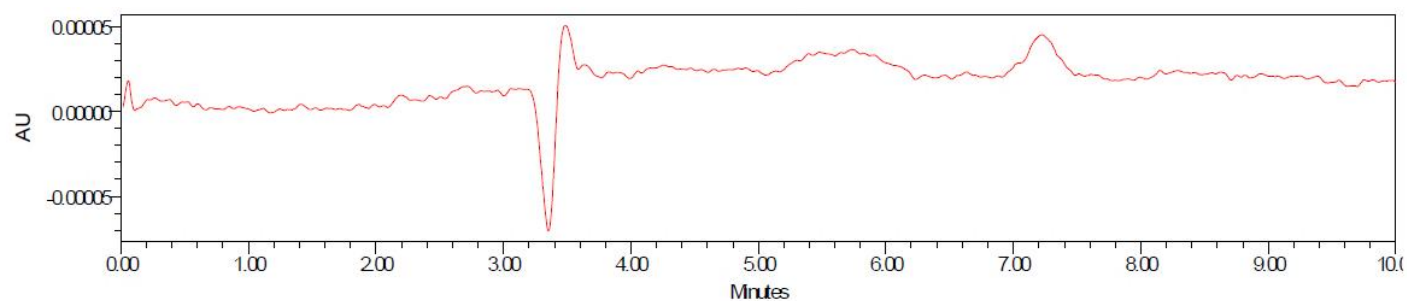
— Sample Name T9\_2; Vial 41; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8nm; Date Acquired 25/08/2017 14:31:46 WEST



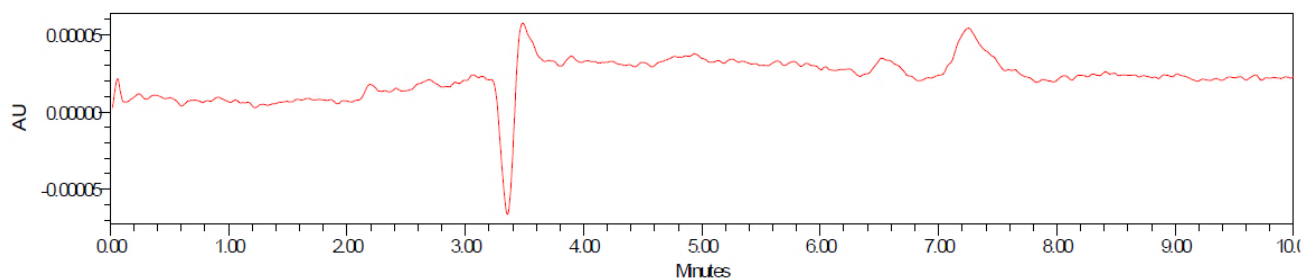
— Sample Name T10\_2; Vial 42; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8nm; Date Acquired 25/08/2017 14:53:46 WEST



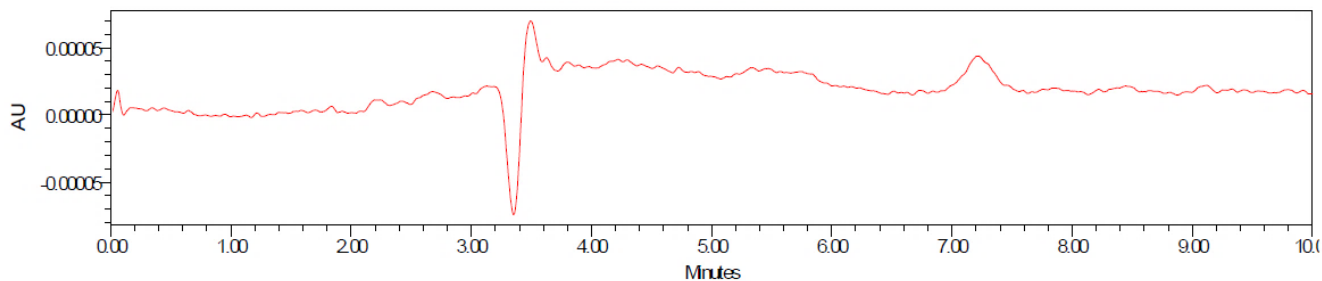
— Sample Name PP100(1)\_2; Vial 43; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8nm; Date Acquired 25/08/2017 15:15:42 WEST



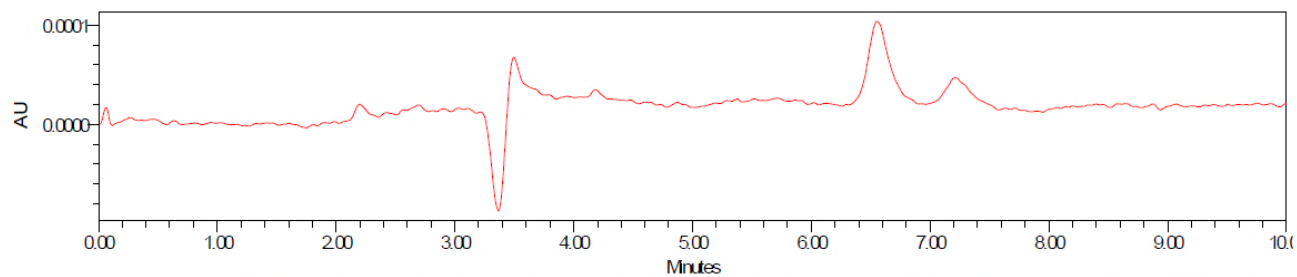
— Sample Name PP100(2)\_2; Vial 44; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8nm; Date Acquired 25/08/2017 15:37:38 WEST



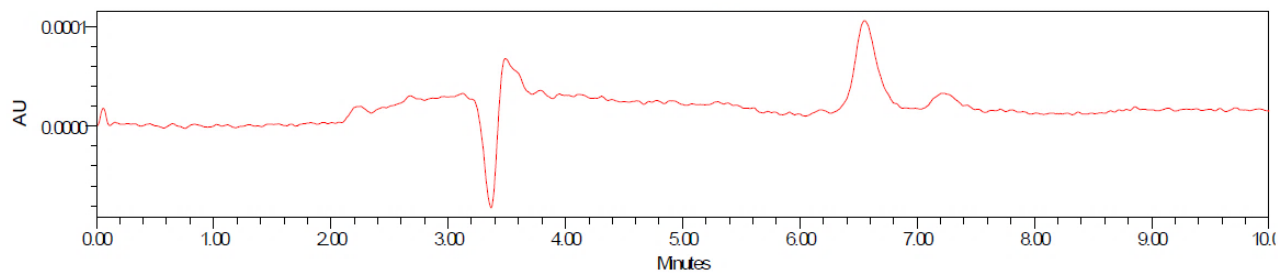
— Sample Name PP250(1)\_2; Vial 45; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 25/08/2017 15:59:41 WEST



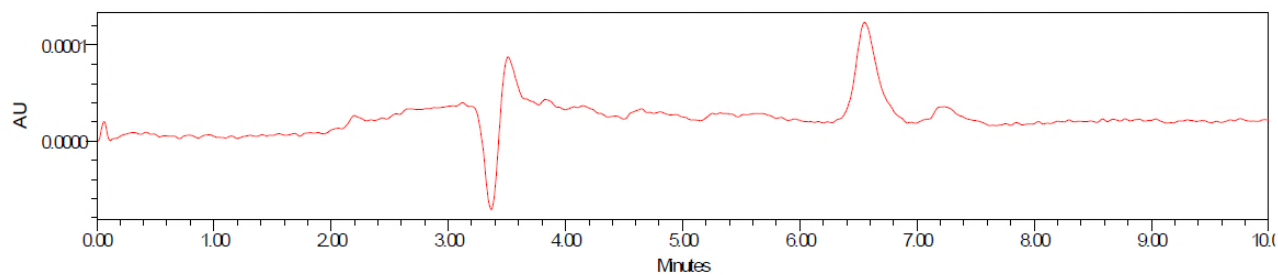
— Sample Name PP250(2)\_2; Vial 46; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 25/08/2017 16:21:40 WEST



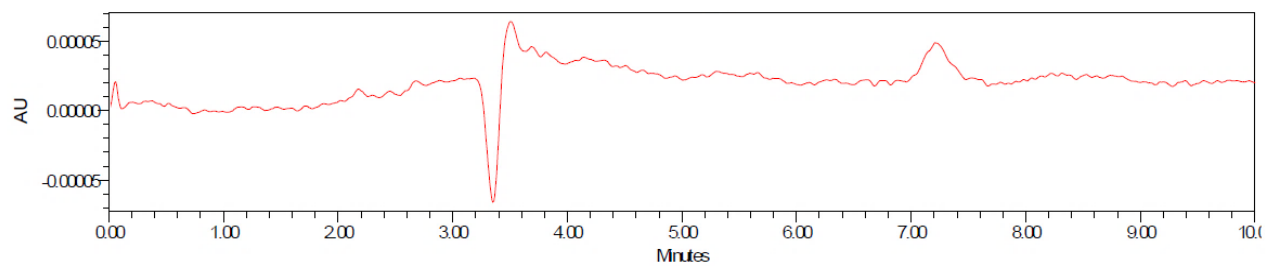
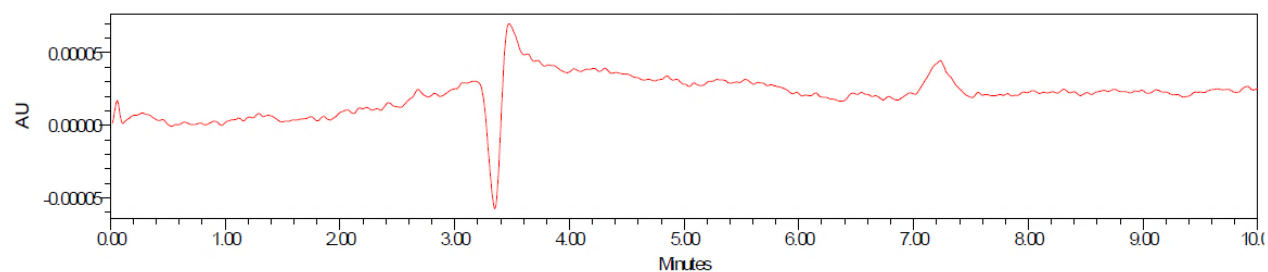
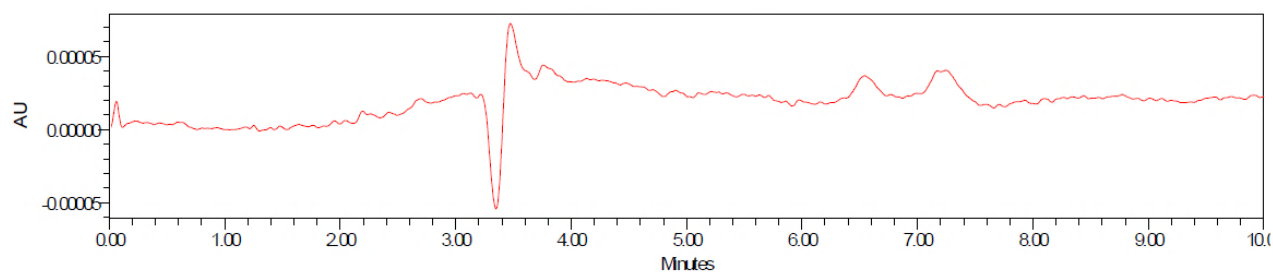
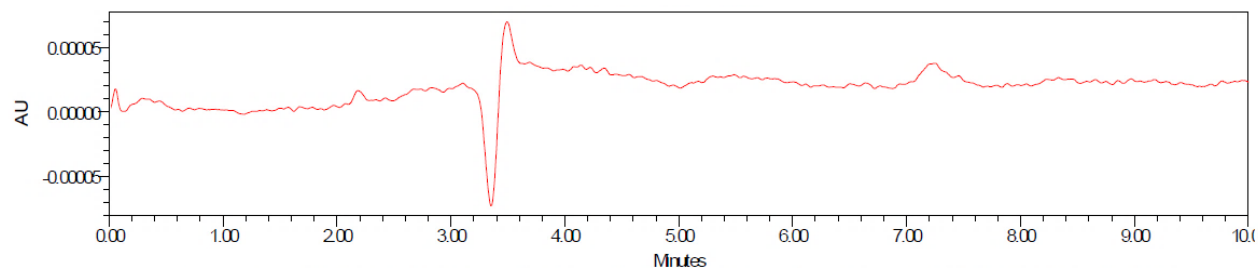
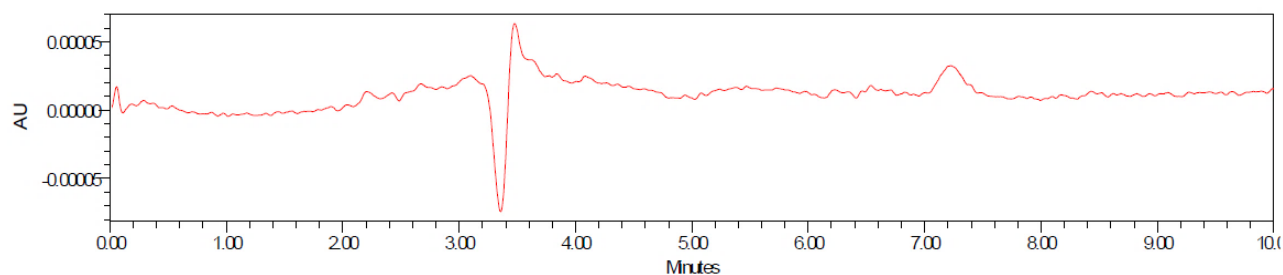
— Sample Name Copofiltracao(1)\_2; Vial 47; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 25/08/2017 16:43:36 WEST

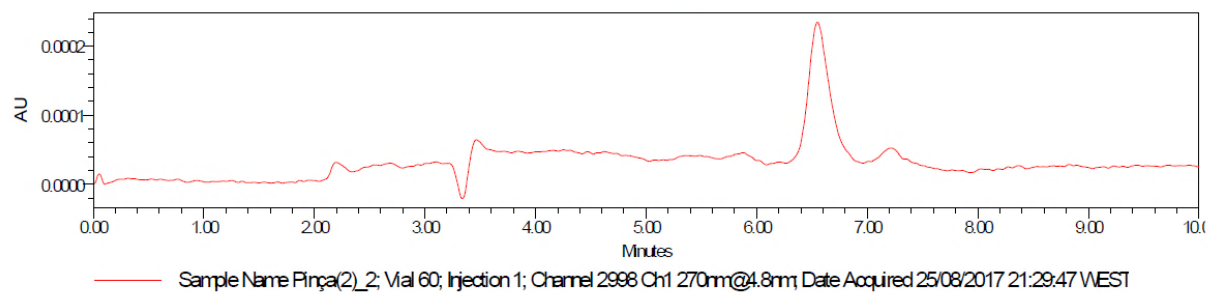
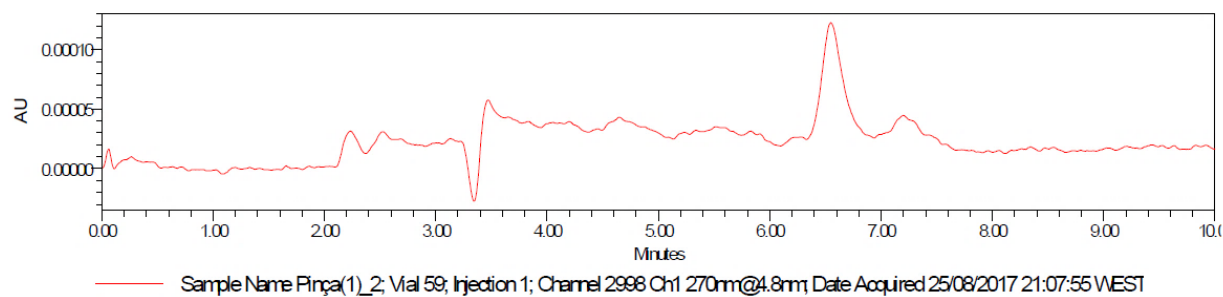
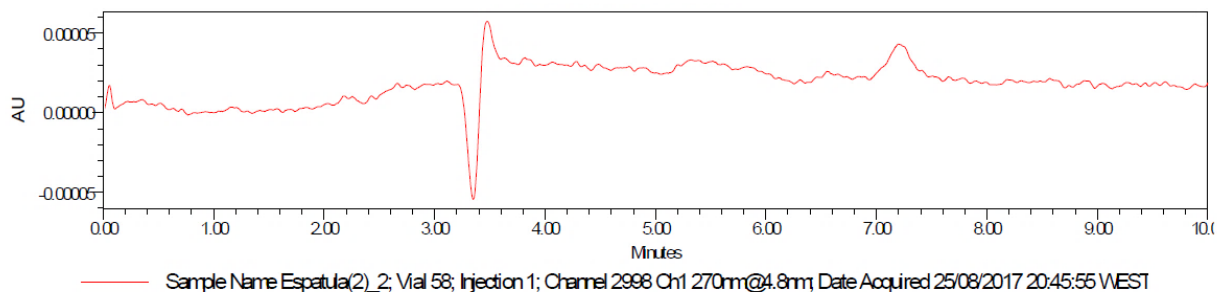
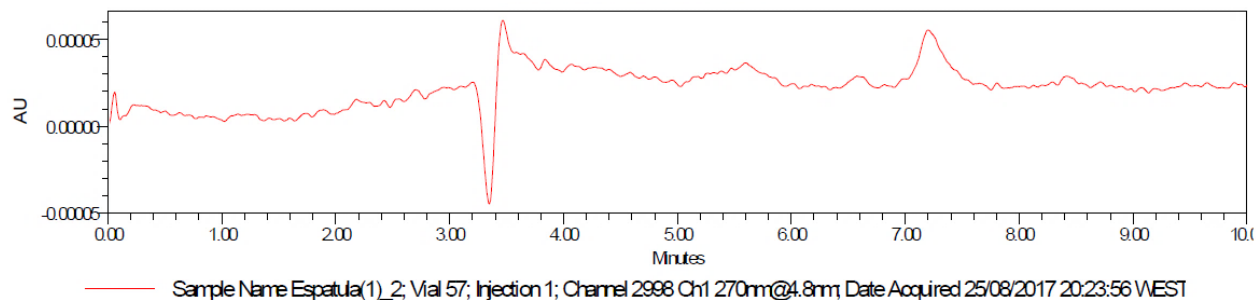
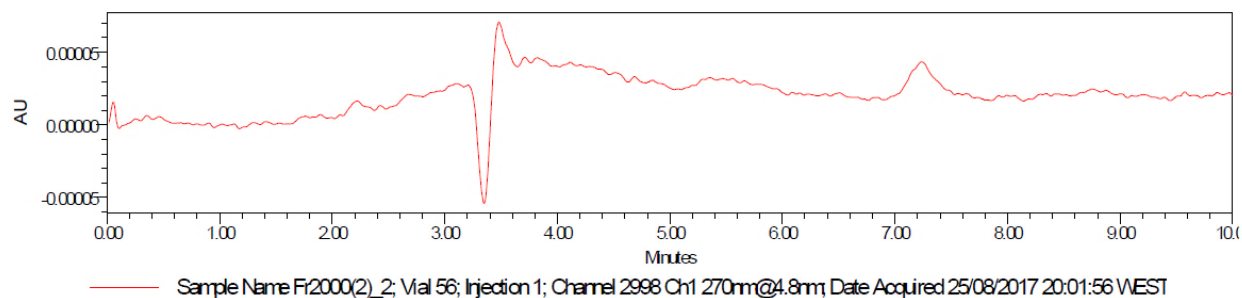


— Sample Name Alnrepilao(1)\_2; Vial 49; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 25/08/2017 17:28:04 WEST



— Sample Name Alnrepilao(2)\_2; Vial 50; Injection 1; Channel 2998 Ch1 270nm@4.8m; Date Acquired 25/08/2017 17:50:04 WEST





## Anexos B

**B1 – PROTOCOLO DE QUALIFICAÇÃO:** Qualificação de Performance das máquinas de lavagem de material do CQ (Q141)

## Anexos C

**C1 – PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO:** Validação do método analítico por HPLC – Sulfametoxazol (VAL018)

**C2 – RELATÓRIO DE VALIDAÇÃO:** Validação do método analítico por HPLC – Sulfametoxazol (RVA018)